

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
KATHY GRENIER

RÔLE DES ISOFORMES D'AKT LORS DE LA DÉCIDUALISATION *IN VITRO*  
DES CELLULES STROMALES ENDOMÉTRIALES HUMAINES

AOÛT 2016

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaite remercier mon directeur de recherche, Éric Asselin, de m'avoir permis de joindre une merveilleuse équipe de travail. Ta disponibilité et ton appui m'ont permis de réaliser mes travaux de recherche. Merci aussi pour ta générosité sans borne et pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès enrichissants.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe pour leur temps, leur expertise, leurs conseils et leur appui. Mesdames Annabelle Veillette, Anne-Marie Fortier, Marie-Judith Lafleur, Stéphanie Lamontagne, France-Hélène Joncas et Messieurs Kevin Brasseur, François Fabi, Jérôme Grenier-Naud et Sébastien Baribeau, merci à vous.

Un remerciement spécial pour mesdames Sophie Parent et Valérie Leblanc pour leur temps, leurs explications et leur aide.

Finalement, merci à ma famille et mon conjoint qui n'ont jamais cessé de croire en moi tout au long de mon parcours et qui continuent de m'épauler dans mon nouveau défi. Votre soutien, vos encouragements et votre amour m'ont permis de persévérer dans cette aventure et me permettre de continuer. Merci à vous.

Merci!

## AVANT-PROPOS

La décidualisation est un phénomène important rencontré chaque mois chez les femmes en âge de procréer et peut avoir de graves conséquences sur la fécondité des femmes. De plus, étant donné que le laboratoire du docteur Éric Asselin se spécialise dans un contexte de cancers féminins affectant l'utérus (endomètre), les ovaires et les seins, le laboratoire possède aussi des cellules normales utérines non cancéreuses dans le but de comparer des situations cancéreuses avec des cellules saines. Ainsi, j'avais en ma possession tous les outils nécessaires pour ce projet. Aussi, le laboratoire a procédé à beaucoup d'études publiées sur Akt, une sérine thréonine kinase cytosolique, et ses effets dans un contexte cancéreux, de même que sa régulation par l'estradiol, une hormone importante rencontrée lors du cycle menstruel. Akt était donc un candidat intéressant à étudier dans un contexte non cancéreux. Le but de ce projet est donc comprendre les rôles d'Akt dans l'utérus en situation normale et son impact lors de l'induction de la décidualisation *in vitro* sur les hormones caractéristiques responsables de ce phénomène, soit la progestérone et l'AMP cyclique.

## RÉSUMÉ

L'infertilité est en constante augmentation au Canada, où 16 % des couples en âge de procréer rencontrent des difficultés à établir et mener à terme une grossesse. Il existe plusieurs causes d'infertilité dont un bon nombre résultent d'une mauvaise communication entre l'embryon et l'endomètre maternelle.

Au cours de chaque cycle menstruel, l'endomètre subit de grands changements. En effet, les cellules stromales endométriales prolifèrent et se différencient pendant un processus appelé la décidualisation. Le changement morphologique rencontré lors de ce processus montre des caractéristiques similaires à la transition mésenchymato-épithéliale (TME) qui est l'opposé de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), observée entre autre lors du passage de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine. La diminution de l'expression de certains facteurs de transcription sont associés à la TME, comme ZEB1, Slug, Snail et Twist. Les mécanismes intracellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation de l'apoptose et dans la prolifération cellulaire pendant la décidualisation de l'endomètre ne sont pas complètement compris.

Il a été montré précédemment que la kinase Akt est impliquée dans la survie cellulaire des cellules endométriales. Cette kinase induit la survie cellulaire et agit comme régulateur de la prolifération cellulaire, la croissance, le métabolisme et l'angiogenèse. Trois isoformes d'Akt ont été identifiées et ont des rôles distincts pendant la gestation. L'objectif de cette étude est de déterminer le rôle de chaque isoforme dans le contexte de la décidualisation. La décidualisation est induite à l'aide du 8-br-AMPC et du MPA et la sécrétion des protéines IGFBP1 et PRL, deux marqueurs connus de décidualisation confirme l'induction.

Nos résultats montrent que pendant la décidualisation, le niveau protéique de chaque isoforme d'Akt est diminué ainsi que leur phosphorylation. Par contre, des analyses de qRT-PCR démontrent que l'expression de l'ARNm des isoformes n'est pas affectée, suggérant que la diminution protéique est un mécanisme post-traductionnelle. Nous avons aussi observé une diminution de l'expression de Slug, une diminution de la phosphorylation de mTOR, un substrat connu d'Akt et une diminution de la motilité cellulaire dû à la diminution des isoformes d'Akt. Finalement, après réexpression des isoformes d'Akt constitutivement actifs, nous observons une diminution des marqueurs de décidualisation.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition d'Akt est importante pour induire la TME et pour l'expression adéquate des marqueurs de décidualisation. Notre hypothèse est que puisque les cellules décidualisées arrêtent leur prolifération pour se différencier, la voie de signalisation Akt doit être inhibée pour permettre la différenciation. Des études additionnelles sont présentement réalisées pour comprendre les rôles spécifiques de chaque isoforme d'Akt dans la décidualisation.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>ii</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....</b>	<b>ix</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Infertilité féminine .....	1
1.2 Modèle .....	2
1.3 Système reproducteur féminin.....	3
1.3.1 L'utérus .....	3
1.3.2 Les ovaires .....	6
1.3.3 Les tubes utérins .....	9
1.3.4 Cycle menstruel utérin et cycle ovarien.....	11
1.3.5 Les hormones sexuelles .....	16
1.4 Implantation embryonnaire.....	19
1.5 La décidualisation .....	23
1.6 Les marqueurs déciduaux .....	26
1.7 Voie de signalisation PI3K/Akt.....	31
1.8 Transition épithéliale à mésenchymale (TEM).....	36
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>ARTICLE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>39</b>
2.1 Contribution des auteurs .....	39
2.2 Résumé de l'article .....	40
2.3 Article scientifique.....	41
Abstract.....	42
Introduction.....	43

Materials and Methods .....	46
Cell culture.....	46
Reagents and antibodies.....	46
<i>In vitro</i> decidualization induction of HIESC .....	47
Prolactin assays.....	47
Proteasomal inhibition .....	47
Protein extraction and Western Blot analysis .....	47
Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	48
Quantitative Real Time RT-PCR.....	49
Production of HIESC cell lines with Tet-inducible constitutive active isoforms .....	50
<i>In vitro</i> decidualization of Tet-inducible HIESC cell lines .....	50
Wound healing assay .....	51
Statistical analysis.....	51
Results .....	51
Decidualization of HIESC .....	51
Expression of Akt isoforms during <i>in vitro</i> decidualization.....	52
<i>In vitro</i> modulation of PI3K/Akt activity and other pathways upon induction of decidualization.....	53
Effect of PI3K/Akt pathway inhibition on cell motility .....	54
Effect of constitutive active Akt isoforms on the decidualization process .....	54
Discussion.....	55
Author's roles.....	58
Acknowledgment.....	58
Funding.....	58
Conflict of interest .....	58
References.....	59
Figures .....	62
Figures legends .....	68

<b>CHAPITRE III</b>	
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>71</b>
3.1 Discussion.....	71
3.2 Perspectives de recherche .....	74
3.3 Conclusion .....	75
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>76</b>



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1	Structure du vecteur rétroviral SSR#69 .....	2
1.2	Schéma de l'appareil reproducteur féminin.....	3
1.3	Structure d'un ovaire et illustration des différents stades de maturation d'un ovule.....	6
1.4	Cycle ovarien et le cycle menstruel .....	11
1.5	Développement préembryonnaire : du zygote au blastocyste.....	19
1.6	Implantation du blastocyste .....	21
1.7	Changement morphologique observée chez les cellules HIESC lors de l'induction de la décidualisation <i>in vitro</i> par le MPA et le 8-br-AMPC.....	23
1.8	Coopération entre les deux voies de signalisation impliquées dans la décidualisation .....	24
1.9	Schéma des différents récepteurs de PRL ainsi que leurs mécanismes conduisant à leurs effets biologiques .....	28
1.10	Voie de signalisation PI3K/Akt.....	31
1.11	Voies de signalisation affectant la TEM .....	36

### Tableau

1.1	Tableau résumé des différents hormones rencontrées lors des cycles ovarien et menstruel .....	16
-----	---	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

8-br-AMPC	8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate
Akt	Activated by kinase tyrosine
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
BAD	Bcl-2-associated death promoter
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
C	Catalytique
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP Response element-binding protein
CREM	cAMP Responsive element modulator
C-Terminale	Extrémité carboxyle
dPRL	Decidual prolactin
E-Box	Enhancer Box
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
Era	Estrogen receptor alpha
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
FSH	Hormone folliculo-stimulante
FOXO1	Forkhead box O1
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
HcG	Human chorionic gonadotropin
HIESC	Human immortalized endometrial stromal cell

HOXA10	Homeobox A10
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP1	Insulin-like growth factor-binding protein 1
I $\kappa$ B	Inositol- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B kinase
JAK2	Janus kinase 2
LH	Hormone lutéinisante
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MET	Mesenchymal–epithelial transition
MPA	Medroxyprogesterone acetate
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen
N-Terminale	Terminaison amine
NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
P-450	Cytochrome p450
P85	p85 regulatory subunit
P110	p110 catalytic subunit
pAkt	PhosphoAkt
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK1	Phosphoinositide-Dependent Kinase-1
PGE2	Prostaglandine E2
PH	Pleckstrin homology domain

PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIA	Phosphatidylinositol ether lipid analogs
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKA	Protein kinase A
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PR	Progesterone receptor
PR-A	Progesterone receptor A
PR-B	Progesterone receptor B
PRKO	Progesterone receptor knock out
PRL	Prolactin
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten
R	Régulatrice
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
RAS	Protéine exprimée par le gène Ras, un proto-oncogène
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
RTK	Receptor tyrosine kinase
S124	Sérine 124
S474	Sérine 474
Ser473	Sérine 473
Ser9	Sérine 9
SHP2	Src Homology Phosphatase 2
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
SV40	Simian vacuolating virus 40

T309	Thréonine 309
T450	Thréonine 450
TAG	T antigen
Thr308	Thréonine 308
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

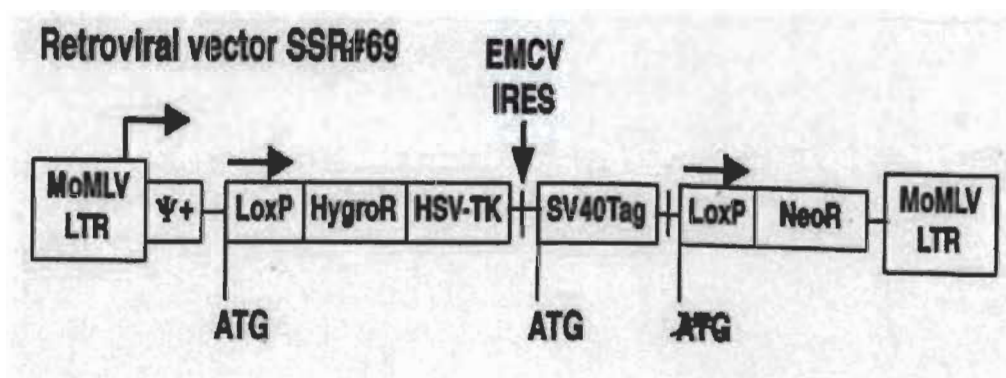
Les sujets de recherche de notre laboratoire sont axés sur deux volets principaux, soit celui de la reproduction et celui concernant le cancer. Certains phénomènes cellulaires sont rencontrés dans ces deux axes de recherche, comme l'apoptose ou la prolifération cellulaire. Ces phénomènes sont régulés par diverses voies de signalisation pouvant conduire dans certains cas à un dérèglement de la balance normalement établi entre ces deux mécanismes contradictoires. Ce dérèglement peut résulter en de graves problèmes au niveau de l'organisme entier. Mon projet de recherche s'inscrit dans l'axe de la reproduction. En effet, j'ai étudié la voie de signalisation cellulaire qui pourrait être impliquée dans la communication existant entre l'endomètre utérin et l'embryon, en agissant sur la réceptivité de l'endomètre aux signaux produits par l'embryon. Cette voie de signalisation se nomme PI3K/Akt. L'infertilité est un sujet important et d'actualité de nos jours, c'est pourquoi l'étude et la compréhension de divers processus reliés à la fertilité sont primordiales.

### 1.1 Infertilité féminine

De nos jours, les femmes sont de plus en plus axées sur l'avancement de leur carrière et elles en viennent à repousser la conception de leur famille. Étant donné que la fertilité des femmes diminue grandement avec l'âge, il n'est pas surprenant de constater une augmentation de l'infertilité. En effet, selon les statistiques de Santé Canada, 16 % des couples canadiens présenteraient des problèmes de fertilité [1]. Bien sûr, ces problèmes de fertilité peuvent résulter tant de la femme que de l'homme. Cette étude rapporte que dans le tiers des diagnostics, il s'agit d'un spermogramme anormal, tandis qu'un autre tiers résulte d'une endométriose ou d'une infection chez la femme [2]. Des problèmes au niveau de l'ovulation sont aussi responsables de 15 % des cas. Par contre,

la cause de 10 % des cas d'infertilité demeure inexpliquée. Certains de ces cas peuvent résulter, comme mentionnée ci-haut, de l'âge avancé de la femme au moment de la décision de fonder une famille. En effet, le nombre d'ovules présents dans les ovaires diminue avec l'âge et le risque de fausses couches augmente. De plus en plus de couples se tournent donc vers les cliniques de fertilité qui sont de plus en plus présentes. La plus grande disponibilité, de même que l'augmentation de la diffusion de l'information concernant ces cliniques ont donc permis à un grand nombre de couples de parvenir à leur but de fonder une famille. Ces cliniques ont aussi connu une nette amélioration des techniques de fécondation *in vitro*. C'est pourquoi nous connaissons une augmentation du nombre d'études concernant l'infertilité.

## 1.2 Modèle



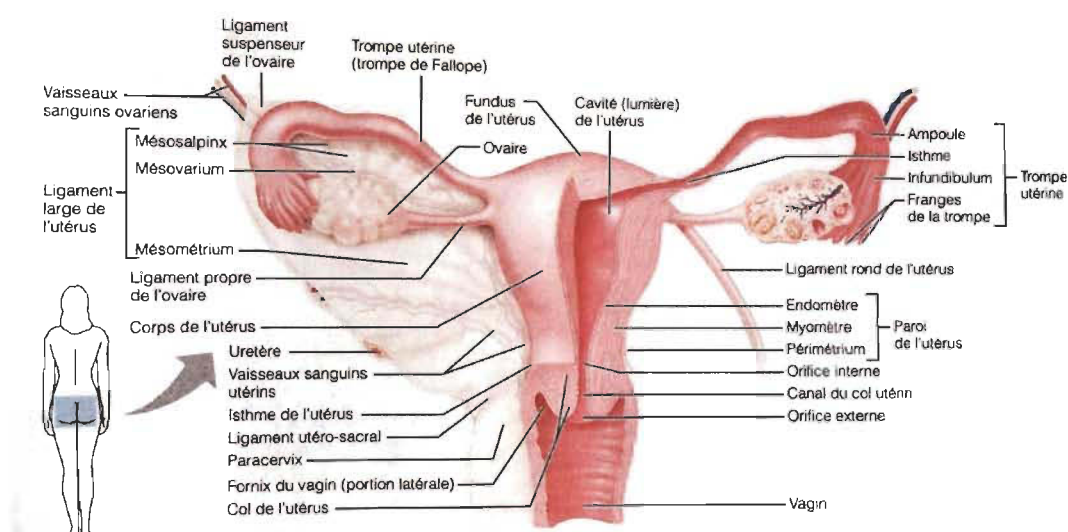
**Figure 1.1** Structure du vecteur rétroviral SSR#69.  
Le vecteur contient le SV40 large TAG pour immortaliser les cellules HIESC et un gène de résistance à l'hygromycine pour la sélection clonale.  
Tirée de [3].

L'endomètre utérin est connu pour être responsable de nombreuses causes d'infertilité étant donné qu'il est le siège de la gestation. Ainsi, sa structure et ses interactions avec l'œuf fécondé et par la suite le fœtus vont influencer le sort de ce dernier. Une anomalie morphologique ou un désordre au niveau de l'endomètre peut donc compromettre les diverses étapes de la gestation survenant dans l'endomètre par exemple, l'implantation ou la décidualisation. Lors de notre étude, nous nous sommes

intéressés à l'endomètre, plus précisément aux cellules stromales de l'endomètre, qui sont le siège de la décidualisation. Pour ce faire, nous avons procédé à la culture de cellules stromales endométriales humaines qui sont nommées HIESC (human immortalized endometrial stromal cell). Ces cellules proviennent du laboratoire du Dr Michel A. Fortier de l'Université Laval et ont été immortalisées par le SV40 (Simian virus 40) large TAG (T antigen) leur assurant une meilleure stabilité et une augmentation de leur durée de vie en culture [3]. Le SV40 a été inséré par infection rétrovirale à l'aide du vecteur rétroviral SSR#69 contenant le SV40 large TAG et un gène de résistance à l'hygromycine servant à la sélection clonale (Figure 1.1). L'insertion du TAG a été confirmée par PCR en utilisant des amorces reconnaissant les séquences pour le gène d'hygromycine et la séquence psi du rétrovirus SSR69. L'immunofluorescence a aussi permis la détection de la protéine TAG directement dans les cellules grâce à l'anticorps spécifique à celle-ci.

### 1.3 Système reproducteur féminin

#### 1.3.1 L'utérus



**Figure 1.2** Schéma de l'appareil reproducteur féminin  
On y voit l'utérus, les ovaires et les trompes utérines  
Tirée de [4].



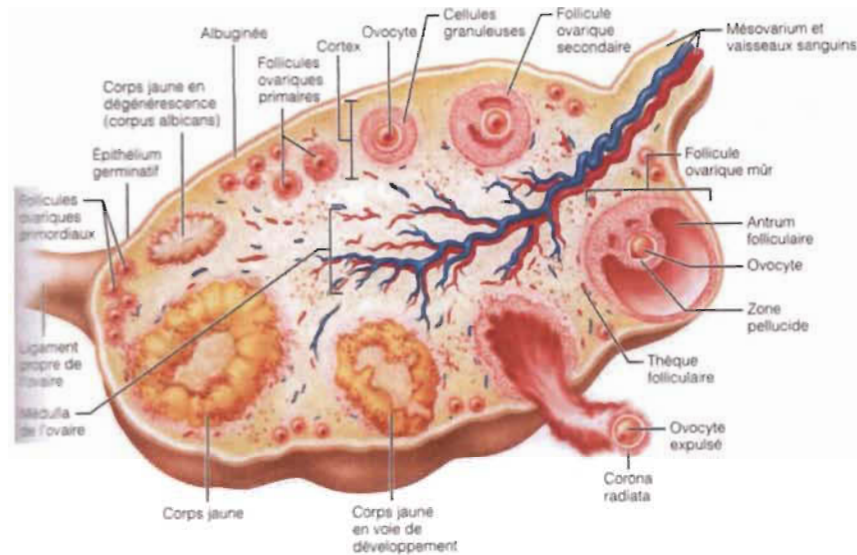
L'appareil reproducteur féminin humain est composé d'organes internes et externes. Le vagin, l'utérus, les ovaires et les trompes de Fallope constituent les organes internes, tandis que la vulve constitue l'organe externe (Figure 1.2). L'utérus humain est l'organe dans lequel l'embryon se développe après la fécondation de l'ovule par un spermatozoïde dans les trompes de Fallope. Les principales fonctions de l'utérus sont de recevoir l'œuf fécondé et de protéger le fœtus pendant son développement. Par la suite, il doit se contracter pour permettre l'expulsion du bébé hors du corps, lors de l'accouchement. Cet organe se situe entre la vessie et le rectum, dans la cavité abdominale inférieure et à la forme d'une poire inversée. Chez les femmes nullipares, c'est-à-dire n'ayant jamais accouchées, l'utérus mesure 7,5 cm de long, 5 cm de large et 2,5 cm d'épaisseur. L'utérus sera plus gros chez une femme ayant déjà été enceinte ou plus petit (atrophie) quand les hormones sexuelles sont basses, par exemple à la ménopause. Anatomiquement, l'utérus est composé de sous-divisions incluant : le corps, le fundus et le col. La partie la plus volumineuse est son corps, la forme en dôme supérieurement aux points d'insertion des trompes de Fallope est le fundus et le col de l'utérus constitue l'orifice de l'utérus et est relié au corps de l'utérus par une partie légèrement rétrécie, l'isthme de l'utérus [4].

Histologiquement, l'utérus a trois couches de tissus qui sont essentielles pour ses fonctions, soit le périmétrium, le myomètre et l'endomètre. La couche externe, le périmétrium ou séreuse, fait partie du péritoine viscéral et est composé d'épithélium pavimenteux simple et de tissu conjonctif aréolaire. Cette partie entoure le corps de l'utérus et une partie du col. Latéralement, il devient le ligament large de l'utérus. La deuxième couche, le myomètre est formée de trois couches de muscles lisses qui sont plus épaisses dans le fundus que dans le col de l'utérus. Les trois couches ont des caractéristiques différentes, la couche de muscle centrale est circulaire tandis que les couches externes et internes sont longitudinales ou obliques. Lors du travail et de l'accouchement, des contractions synchronisées du myomètre en réponse à l'ocytocine sécrétée par la neurohypophyse aident à expulser le fœtus de l'utérus. Finalement, la couche interne, l'endomètre, est hautement vascularisée et est composée d'un épithélium prismatique simple contenant des cellules ciliées et sécrétoires. Sous l'épithélium se

trouve le stroma endométrial qui est une région épaisse de *lamina propria* (tissus conjonctifs aréolaires). On retrouve également des glandes utérines endométriales développées comme des invaginations de l'épithélium luminal et s'étend presque jusqu'au myomètre. L'endomètre est divisé en deux couches. Le *stratum functionalis* (couche fonctionnelle) qui tapisse la cavité utérine va subir des modifications cycliques en réponse aux concentrations sanguines d'hormones ovariennes, ce qui va causer son détachement lors des menstruations. La couche plus mince et plus profonde, le *stratum basalis* (couche basale) est permanente et permet la formation d'une nouvelle couche fonctionnelle après chaque menstruation (Figure 1.2). Elle n'est pas influencée par les hormones ovariennes [5].

La vascularisation de l'utérus est importante pour permettre à l'utérus de remplir ses fonctions. La vascularisation de cet organe se fait par les artères utérines qui naissent des artères iliaques internes. Les artères utérines vont donner des branches appelées artères arquées qui s'arrangent de façon circulaire dans le myomètre. Elles vont par la suite donner des branches appelées artères radiales qui pénètrent profondément dans le myomètre. Juste avant que les branches entrent dans l'endomètre, elles se divisent en deux sortes d'artérioles, les artérioles droites irriguent la couche basale et acheminent les hormones nécessaires pour régénérer la couche fonctionnelle et les artérioles spiralées alimentent la couche fonctionnelle et vont beaucoup changer durant le cycle menstruel. En effet, ce sont leurs spasmes qui provoquent la desquamation de la couche fonctionnelle au cours des menstruations. Le sang qui quitte l'utérus est drainé par les veines utérines dans les veines iliaques internes. Une grosse quantité de sang est requise à l'utérus pour permettre la régénération d'une nouvelle couche fonctionnelle après les menstruations, à l'implantation d'un ovule fécondé et au développement d'un placenta [4].

### 1.3.2 Les ovaires



**Figure 1.3 Structure d'un ovaire et illustration des différents stades de maturation d'un ovule.**  
Tirée de [4].

Les ovaires sont les gonades femelles qui produisent les gamètes féminins, c'est-à-dire l'ovocyte secondaire qui se développe en œuf mature après la fertilisation. Ils sont au compte de deux, situés de chaque côté de l'utérus et leur longueur est d'environ 4 cm. Leur principale fonction est de produire les gamètes, mais ils produisent également les hormones sexuelles comme la progestérone et l'oestrogène, en plus de produire d'autres hormones comme l'inhibine et la relaxine. Les ovaires sont composés de différentes parties, l'épithélium superficiel, qui recouvre l'ovaire, l'albuginée, qui est une capsule de tissu conjonctif, le cortex ovarien, contenant les follicules en développement et la médulla au centre. C'est dans la partie centrale que vont circuler les nerfs, les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques irriguant ces organes [4] (Figure 1.3).

Les follicules ovariens sont situés dans le cortex et on les retrouve en différents stades de développement. Pour identifier le stade de développement des follicules, il faut observer le nombre, de même que la forme des couches de cellules qui l'entourent. À la

naissance, le cortex des ovaires est constitué d'environ 1 million de follicules primordiaux. Ces derniers sont entourés de cellules folliculaires aplaties provenant du stroma ovarien. Lorsque ces cellules sont en une seule couche simple, elles sont appelées cellules folliculaires et lorsqu'elles sont en plusieurs couches, elles deviennent les cellules de la granulosa. Ces cellules entourant les ovocytes en développement servent à nourrir l'ovocyte et vont aussi sécréter l'oestrogène lorsque le follicule devient plus gros. À la puberté, un certain nombre de follicules primordiaux vont grossir, soit environ une dizaine par jour. Par contre, lors du cycle ovarien d'une durée d'environ 28 jours, un seul follicule se rendra au stade préovulatoire. Ainsi, à chaque mois après la puberté et jusqu'à la ménopause, les gonadotrophines; l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), sécrétées par l'adénohypophyse, vont stimuler le développement de plusieurs follicules primordiaux, mais seulement un va atteindre la maturité nécessaire à l'ovulation. Une femme va donc normalement produire et sécréter au cours de sa vie, 500 follicules matures [6].

Le développement des follicules primordiaux en follicules matures se fait en différentes étapes. Tout d'abord, quelques follicules primordiaux vont amorcer leurs maturations et vont atteindre le stade de follicule primaire. Lors de cette étape, les cellules de type squameuses autour de l'ovocyte primaire croissent et deviennent cuboïdes. De plus, l'ovocyte grossit. Ensuite, la maturation va se poursuivre en follicule secondaire. Pour se faire, les cellules folliculaires prolifèrent jusqu'à ce qu'elles forment un épithélium stratifié autour de l'ovocyte, ce qu'on appellera alors cellules de la granulosa. Aussi, à cette étape, la thèque folliculaire sera formée. Celle-ci est formée par une couche de cellules stromales entourant la membrane basale du follicule. La thèque folliculaire va se différencier en deux couches distinctes, la thèque interne et la thèque externe. La thèque interne est une couche interne de cellules sécrétoires cuboïdes fortement vascularisées, qui vont sécréter l'oestrogène. La thèque externe est une couche externe composée de cellules stromales et de fibres de collagènes. De plus, les cellules de la granulosa commenceront à sécréter du fluide folliculaire, lequel va créer une cavité appelée l'antra folliculaire, dans le follicule secondaire. Pendant ce stade, la couche la plus interne des cellules de la granulosa deviennent attachées fermement à la zone

pellucide. Cette couche de cellules prendra le nom de *corona radiata*. Pour ce qui est de la zone pellucide, celle-ci est une membrane formée entre l'ovocyte primaire et les cellules de la granulosa, dans le follicule. Cette dernière est formée par les glycoprotéines sécrétées par l'ovocyte. Par la suite, le follicule secondaire va grossir et devenir un follicule mature. La principale caractéristique de ce stade est que l'antra folliculaire formé par le fluide sécrété va isoler l'ovocyte, entouré de sa capsule granuleuse (*corona radiata*), sur un pédicule situé à un pôle du follicule. Le follicule ovarien est alors mûr. À ce stade, il mesure environ 2,5 cm de diamètre et il fait sailli à la surface externe de l'ovaire [4, 6] (Figure 1.3).

L'ovocyte primaire diploïde dans le follicule mature va compléter la méiose I ce qui va produire deux cellules haploïdes ( $n$ ) de grosseur inégale, chacune contenant 23 chromosomes. La plus petite cellule produite par la méiose I est appelée premier corps polaire. La plus grosse cellule appelée l'ovocyte secondaire est celle qui reçoit le plus de cytoplasme. Une fois que l'ovocyte secondaire est formé, il va commencer la méiose II, mais celle-ci s'arrête en métaphase. Le follicule mature ou follicule De Graaf va par la suite se rompre et libérer l'ovocyte secondaire, c'est ce qui se nomme l'ovulation (Figure 1.3).

À l'ovulation, l'ovocyte secondaire est expulsé dans la cavité pelvienne avec sa *corona radiata* et le corps polaire et seront captés par les tubes utérins. Si la fertilisation ne survient pas, les cellules dégénèrent. Si des spermatozoïdes sont présents dans le tube utérin, un spermatozoïde va pénétrer l'ovocyte secondaire, ce qui permet à la méiose II de se compléter. L'ovocyte secondaire va alors se séparer en deux cellules haploïdes, une fois de plus de grosseur inégale. La cellule la plus grosse est l'œuf mature et la plus petite est le second corps polaire. Le noyau de la cellule spermatique et l'œuf mature vont s'unir et former un zygote diploïde [4, 6].

Après l'ovulation, les taux d'hormones sont importants pour permettre une gestation et leur production sera assurée par le corps jaune. Ce dernier est formé par les cellules de la granulosa qui ont grossi et les cellules de la thèque interne. Dès sa

formation, le corps jaune va sécréter de la progestérone principalement, de l'oestrogène, de la relaxine et de l'inhibine. S'il n'y a pas de grossesse, après environ dix jours, le corps jaune va se dégénérer par apoptose. Ainsi, la production d'hormones cessera. Il sera ensuite plus qu'une cicatrice appelé corps blanc. Par contre, s'il y a fécondation le corps jaune persiste jusqu'à ce que le placenta soit prêt à produire les hormones, ce qui prend environ trois mois [7].

### 1.3.3 Les tubes utérins

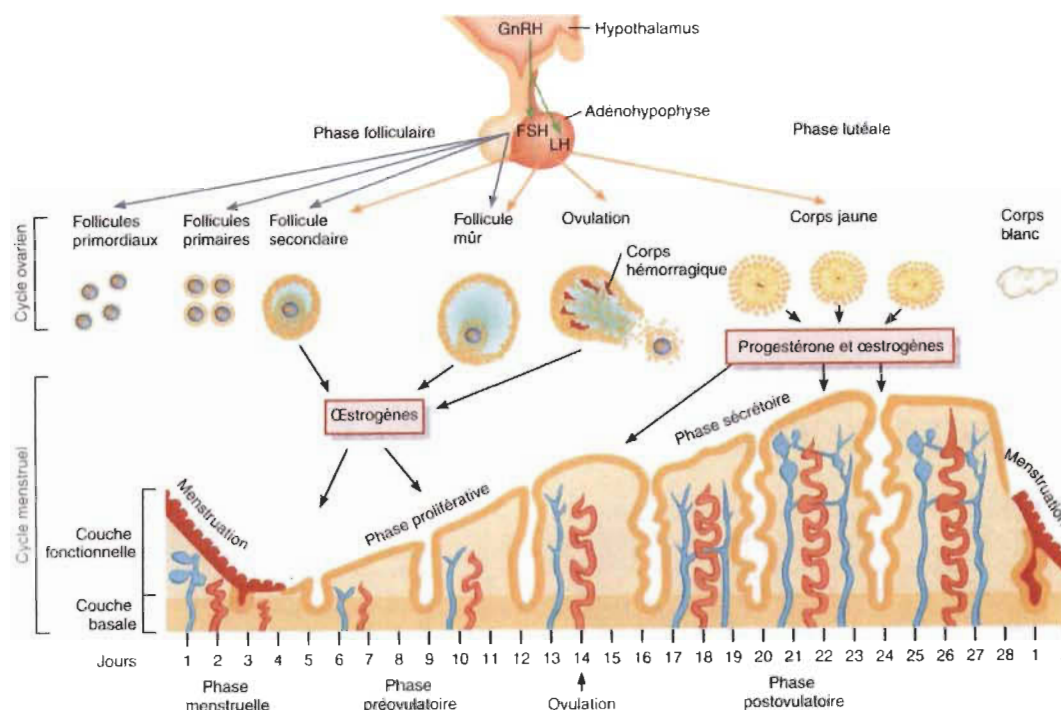
Nous avons vu que l'utérus est le siège de la gestation puisqu'il s'adaptera pour accueillir l'embryon et que les ovaires eux produisent les gamètes pour permettre une fécondation, mais il reste une structure importante au système reproducteur féminin qui servira à attraper l'ovule et permettra sa fécondation et le transport. Cette structure correspond aux tubes utérins, aussi appelés trompes de Fallope ou oviductes. Les femmes ont deux tubes utérins, positionnés latéralement de l'utérus. Les tubes qui mesurent environ 10 cm de long se situent dans les plis des ligaments larges de l'utérus (Figure 1.2). Ils constituent le chemin emprunté par les spermatozoïdes pour atteindre l'ovule et permettent le transport l'ovocyte secondaire ou l'ovule fécondé, des ovaires à l'utérus. Morphologiquement, les tubes utérins sont composés de trois différentes parties que sont l'infundibulum, l'ampoule et l'isthme. La partie en forme d'entonnoir à l'extrémité de chaque tube appelé infundibulum, est près de l'ovaire et est ouverte dans la cavité pelvienne. Ces tubes se terminent par une frange de projections ciliées digitiformes appelées les franges de la trompe. Depuis l'infundibulum, le tube utérin s'étend médialement et inférieurement et s'attache à l'angle supérieur latéral de l'utérus. L'ampoule du tube utérin est la partie la plus large et la plus longue, correspondant au deux tiers de la longueur totale. De plus, c'est à cet endroit que se produira la fécondation. Finalement, l'isthme des tubes utérins est la portion la plus médiale et est une partie courte qui se joint à l'utérus [4] (Figure 1.2).

Histologiquement, les tubes utérins sont composés de trois couches, la couche muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse, qui est pleine de replis, est



constituée d'un épithélium prismatique simple et d'une *lamina propria*. L'épithélium contient des cellules ciliées, lesquelles permettent d'aider le mouvement de l'ovule fécondé dans le tube utérin jusqu'à l'utérus par le battement des cils. Les cellules non ciliées possèdent beaucoup de microvillosités et sécrètent un fluide qui humidifie et nourrit l'ovule et même les spermatozoïdes, s'ils sont présents. La couche du milieu, la musculuse, est composée d'une couche interne qui consiste en un anneau circulaire de muscle lisse épais et d'une couche externe qui est une région mince de muscle lisse longitudinal. Les contractions péristaltiques de la musculuse vont aussi contribuer au déplacement de l'ovocyte ou de l'ovule fécondé vers l'utérus. La couche externe des tubes utérins est une membrane séreuse, le péritoine viscéral. Après l'ovulation, les courants locaux sont produits par les mouvements des franges des tubes utérins, qui entourent la surface du follicule mûr juste avant que l'ovulation se produise. Ces courants balaient l'ovocyte secondaire expulsé dans cavité péritonéale et l'attire dans le tube utérin. Un spermatozoïde pourra alors rencontrer et fertiliser l'ovocyte secondaire dans l'ampoule du tube utérin. La fertilisation peut survenir jusqu'à 24 heures après l'ovulation. Quelques heures après la fertilisation, le matériel nucléaire de l'ovule haploïde et du spermatozoïde s'unissent. L'ovule fécondé diploïde est maintenant appelé un zygote et commence la division cellulaire pendant son trajet vers l'utérus. Il arrive dans l'utérus de 6 à 7 jours après l'ovulation. Si n'y a pas eu de fertilisation, l'ovocyte secondaire se désintègre [4, 7].

### 1.3.4 Cycle menstruel et cycle ovarien



**Figure 1.4 Cycle ovarien et le cycle menstruel.**  
**Le schéma présente les différentes étapes de ces cycles de même que les principales hormones impliquées dans ces processus.**  
 Tirée de [8].

Durant leurs années reproductives, les femmes non enceintes subissent normalement des changements cycliques dans les ovaires et l'utérus. Chaque cycle menstruel prend environ un mois et implique d'une part l'ovogenèse et d'une autre part la préparation de l'utérus à recevoir un ovule fécondé. Ces principaux changements sont contrôlés par les hormones sécrétées par l'hypothalamus, l'adénohypophyse et les ovaires. Le cycle utérin et le cycle ovarien s'opèrent en parallèle dans leurs structures respectives, mais sont tout de même synchronisés. Le cycle ovarien est une série d'événements dans les ovaires qui surviennent durant et après la maturation d'un ovocyte. Le cycle utérin est quant à lui une série de changements que subit l'endomètre de l'utérus. Ces changements ont pour but de le préparer à l'arrivée d'un ovule fécondé qui va s'y développer jusqu'à l'accouchement. Si la fertilisation ne survient pas, les



hormones ovariennes diminuent, ce qui cause l'expulsion de la couche fonctionnelle de l'endomètre [6].

Du côté des ovaires, le cycle ovarien est séparé en trois étapes soit, la phase folliculaire, l'ovulation et la phase lutéale. D'abord, la phase folliculaire est la période de croissance du follicule puis l'ovulation survient au jour 14 du cycle. Finalement, la phase lutéale qui est la période d'activité du corps jaune. Du côté de l'utérus, le cycle menstruel utérin comporte lui aussi trois étapes que sont la phase menstruelle, la phase proliférative et la phase sécrétoire (Figure 1.4). La croissance folliculaire a été abordée au chapitre 1.3.2, alors je discuterai ici des interactions hormonales survenant au cours du cycle ovarien et du cycle utérin [4].

La régulation hormonale de ces deux cycles se fait par la régulation des taux de GnRH (Gonadotropin releasing hormone) sécrétée par l'hypothalamus. Cette dernière stimule la sécrétion et la libération de FSH et LH par l'adénohypophyse. La FSH initie la croissance folliculaire, tandis que LH stimule la maturation des follicules ovariens. Ainsi, l'activité endocrine ovarienne se manifeste pour la première fois lors de la pleine maturation sexuelle de la puberté, par deux sécrétions stéroïdiennes principales : les oestrogènes et les progestagènes. Une des caractéristiques différentielles de l'ovaire lorsque comparé aux testicules est que la libération des gamètes se fait épisodiquement, lors de l'ovulation. Ainsi, la période précédant l'ovulation est caractérisée par une dominance oestrogénique, tandis que la période post-ovulatoire est sous dominance progestative. La raison de cette cyclicité de l'activité reproductrice de la femelle est que le tractus génital doit remplir deux fonctions reproductrices bien distinctes, soit le transport des gamètes et le développement du conceptus. Chaque cycle témoigne de ces deux objectifs. Pendant la phase oestrogénique, l'ovaire prépare la femme à la réception des spermatozoïdes et à la fécondation de l'ovocyte et pendant la seconde phase, la phase progestative, l'ovaire prépare la femme à accueillir et à nourrir le conceptus au cas où une fécondation efficace aurait eu lieu. Le cycle menstruel est la combinaison des cycles ovarien et utérin. Il peut durer de 24 à 36 jours. Pour l'explication des différentes étapes, on assume qu'en moyenne le cycle menstruel est d'une durée de 28 jours et qu'il

est divisé en quatre différentes étapes : la phase menstruelle, la phase préovulatoire, l'ovulation et la phase post-ovulatoire [6] (Figure 1.4).

La phase menstruelle aussi appelée les menstruations s'étend sur les cinq premiers jours du cycle. Dans les ovaires, sous l'influence de la FSH, plusieurs follicules primordiaux vont se développer en follicules primaires et puis en follicules secondaires. Dans l'utérus, le flux menstruel consiste en 50 à 150 mL de sang, fluide tissulaire, de mucus et de cellules épithéliales provenant de l'endomètre. Les menstruations surviennent en raison de la diminution de la progestérone et des oestrogènes, ce qui stimule la libération de prostaglandines. Celles-ci causent la constriction des artérioles spiralées utérines. Ainsi, les cellules normalement irriguées par ces artérioles sont privées d'oxygène et vont commencer à mourir. Éventuellement, la couche fonctionnelle entière va se détacher. Une fois la couche fonctionnelle expulsée par les menstruations, l'endomètre sera très mince (2 à 5 mm), étant donné que seulement la couche basale demeure en place. La phase menstruelle constitue la période durant laquelle les hormones ovariennes sont à leurs plus bas niveaux. Pendant ce temps, la sécrétion de gonadotrophines a commencé juste avant le début du cycle. Ainsi, les taux de FSH et LH augmentent progressivement et stimulent les follicules ovariens à sécréter les oestrogènes. La LH stimule les cellules de la thèque d'un follicule développé à produire les androgènes. Sous l'influence de la FSH, les androgènes sont captés par les cellules granuleuses du follicule et seront convertis en œstrogène [7] (Figure 1.4).

La phase préovulatoire se situe entre la fin des menstruations et l'ovulation. C'est la phase la plus variable en durée, qui peut varier entre 6 et 13 jours dans un cycle de 28 jours. Dans les ovaires, les follicules secondaires commencent à sécréter les oestrogènes et l'inhibine. Vers le jour 6, un seul follicule secondaire dans un des deux ovaires surpasse les autres et devient le follicule dominant. Les oestrogènes et l'inhibine sécrétés par le follicule dominant diminuent la sécrétion de FSH, ce qui induit l'arrêt de croissance des autres follicules moins développés et induit l'atrésie. Normalement, le follicule dominant devient le follicule mature ou follicule De Graaf. Ce dernier continue de grossir jusqu'à atteindre plus de 20 mm de diamètre et est maintenant prêt à

l'ovulation. La phase menstruelle et la phase de préovulation du cycle menstruel correspondent à la phase folliculaire du cycle ovarien, dû à la croissance et au développement des follicules. Dans l'utérus, les oestrogènes libérés dans le sang par le follicule en développement stimulent la réparation de l'endomètre. Ainsi, les cellules de la couche basale subissent de nombreuses mitoses et produisent une nouvelle couche fonctionnelle. À mesure que l'endomètre s'épaissit, les glandes endométriales se développent et les artérioles d'abord courtes et droites deviennent de plus en plus longues et spiralées. L'épaisseur de l'endomètre va approximativement doublée pour devenir entre 4 et 10 mm d'épaisseur. Il y aura aussi synthèse de récepteurs à la progestérone dans les cellules endométriales. Cette étape dans l'utérus correspond à la phase proliférative du cycle utérin étant donné que l'endomètre prolifère [7] (Figure 1.4).

Au milieu du cycle, un taux élevé d'oestrogènes exerce un rétrocontrôle positif sur les cellules qui sécrètent la LH et la GnRH, ce qui provoque une libération brusque de LH accumulée par l'adénohypophyse. Cette libération brusque de LH déclenche l'ovulation et permet la formation du corps jaune. L'ovulation se définit comme étant la rupture du follicule mature et la libération de l'ovocyte secondaire dans la cavité pelvienne. Elle survient au jour 14 du cycle menstruel. Durant l'ovulation, l'ovocyte secondaire sort de son follicule, mais demeure entouré par la zone pellucide et la corona radiata [9] (Figure 1.4).

La phase post-ovulatoire se situe entre l'ovulation et l'apparition des prochaines menstruations, du jour 15 au jour 28. Dans les ovaires, le mélange de cellules de la thèque interne et des cellules granuleuses va créer le corps jaune sous l'influence de la LH. Stimulé par la LH, le corps jaune sécrète la progestérone, les oestrogènes, la relaxine et l'inhibine [7]. Au moins six différents oestrogènes ont été isolés du plasma féminin, mais seulement trois sont présents en quantités significatives soit, le  $17\beta$ -estradiol, l'estrone et l'estriol. Chez les femmes non-enceintes, l'oestrogène le plus abondant est le  $17\beta$ -estradiol qui est synthétisé à partir du cholestérol dans les ovaires [2]. Cette période est donc appelée la phase lutéale. Par la suite, le reste des événements

dépendent de la fertilisation ou non de l'ovocyte. Si l'ovocyte n'est pas fertilisé, le corps jaune a une durée de vie de seulement deux semaines. Après ce temps, son activité sécrétoire diminue et il dégénère en corps blanc. Ainsi, les niveaux de progestérone, d'oestrogènes et d'inhibine diminuent, ce qui augmentent la libération de GnRH, FSH et LH dû à la perte du rétrocontrôle négatif exercé par les hormones ovariennes. Un nouveau cycle ovarien débutera alors. Par contre, si l'ovocyte secondaire est fertilisé et commence à se diviser, le corps jaune persiste plus longtemps et est soutenu par la génération de la hCG (human chorionic gonadotropin). Cette hormone est produite par le chorion de l'embryon, huit jours après la fertilisation. Comme la LH, la hCG stimule l'activité sécrétoire du corps jaune. La présence d'hCG dans le sang maternel ou dans l'urine est un indicateur de grossesse. Dans l'utérus, la progestérone et les oestrogènes produits par le corps jaune permettent la croissance et l'enroulement des glandes endométriales, la vascularisation de l'endomètre superficiel et l'épaississement de l'endomètre. Les glandes endométriales vont alors acquérir une activité sécrétoire. Principalement, elles vont sécréter du glycogène, cette période correspond à la phase sécrétoire du cycle utérin. Ces changements préparatoires à l'implantation d'un embryon surviennent une semaine après l'ovulation et sont appelés la décidualisation. Cela correspond au moment où un ovule fécondé peut arriver dans l'utérus. Le cytoplasme des cellules décidualisées va donc être rempli de lipides et de glycogènes. Ceux-ci vont servir de nutriments à l'embryon en développement, le temps que le placenta se développe. Si la fertilisation ne survient pas, le niveau de progestérone et d'oestrogènes diminue dû à la dégénération du corps jaune, ce qui prive l'endomètre de son soutien hormonal. Les artères spiralées deviennent alors tortueuses et présentent des spasmes. Les lysosomes des cellules endométriales ainsi privées d'oxygènes et de nutriments se rompent. La couche fonctionnelle va alors s'autodigérer et va conduire aux menstruations et le début d'un nouveau cycle [6] (Figure 1.4).

### 1.3.5 Les hormones sexuelles

**Tableau 1 : Tableau résumé des différents hormones rencontrées lors des cycles ovarien et menstruel**

Hormones	Sécrété par	Fonctions
GnRH	Hypothalamus	Stimule la sécrétion et la libération de FSH et LH
hCG	Chorion de l'embryon	Soutient le corps jaune et stimule l'activité sécrétoire du corps jaune
FSH	Adénohypophyse	Induit la croissance folliculaire et la sécrétion des oestrogènes dans les ovaires
LH	Adénohypophyse	Induit la sécrétion des oestrogènes et progestérones dans les ovaires, stimule l'ovulation et formation du corps jaune, stimule la maturation des follicules ovariens
PRL	Adénohypophyse	Stimule la production du lait dans les glandes mammaires
Oestrogène	Thèque interne et corps jaune	Développement et maintien de la fonction cyclique de l'appareil génital féminin et des caractères secondaires.
Progestérone	Corps jaune	Permet la croissance et l'enroulement des glandes endométriales, la vascularisation de l'endomètre superficiel et l'épaississement de l'endomètre
Inhibine	Cellules granuleuses de follicule en développement et corps jaune	Inhibe la sécrétion de FSH et LH
Relaxine	Corps jaune	Relaxe l'utérus en inhibant les contractions du myomètre

Étant donné que les hormones sexuelles sont aussi importantes pour l'élaboration des cycles ovarien et utérin, il est important de comprendre leurs structures et leurs rôles. D'abord, il faut savoir que les hormones sexuelles sont des hormones stéroïdiennes, c'est-à-dire que ce sont des stéroïdes agissant comme les hormones. Les deux principaux types d'hormones sexuelles sont les oestrogènes et les progestagènes. Ces stéroïdes sont dérivés d'un stérol précurseur ou cholestérol. Le cholestérol est synthétisé dans de nombreux tissus à partir d'acétate. Le principal rôle du cholestérol est au niveau structurel. En effet, le cholestérol est un élément essentiel pour la structure des membranes cellulaires. La synthèse de tous les stéroïdes principaux commence par la conversion du cholestérol en pregnénolone. Cette conversion s'effectue au niveau de la membrane interne des mitochondries. Pour ce faire, elle nécessite du NADPH, de l'oxygène et du cytochrome P-450. La pregnénolone est ensuite convertie en stéroïdes par le réticulum endoplasmique lisse. Les quatre familles principales de stéroïdes sont : les progestagènes, les androgènes, les oestrogènes et les corticostéroïdes, par contre les trois premières sont les seules stéroïdes sexuels [2].

Pour ce qui est des rôles de ces différents stéroïdes, en général, les progestagènes sont associées à la promotion et au maintien de la grossesse, les androgènes au développement et au maintien des caractères sexuels et de la fertilité du mâle et les oestrogènes au développement et au maintien des caractéristiques sexuelles et de la fertilité féminine. Il existe aussi d'autres types d'hormones reproductives classées selon leur type par exemple, les écosanoïdes qui comprennent les prostaglandines et leucotriènes, les hormones protéiques comme les glycoprotéines gonadotropes (FSH, LH, HCG), les polypeptides somato-mammotropes (PRL), les cytokines et les petits peptides (GnRH, ocytocine, vasopressine) [2].

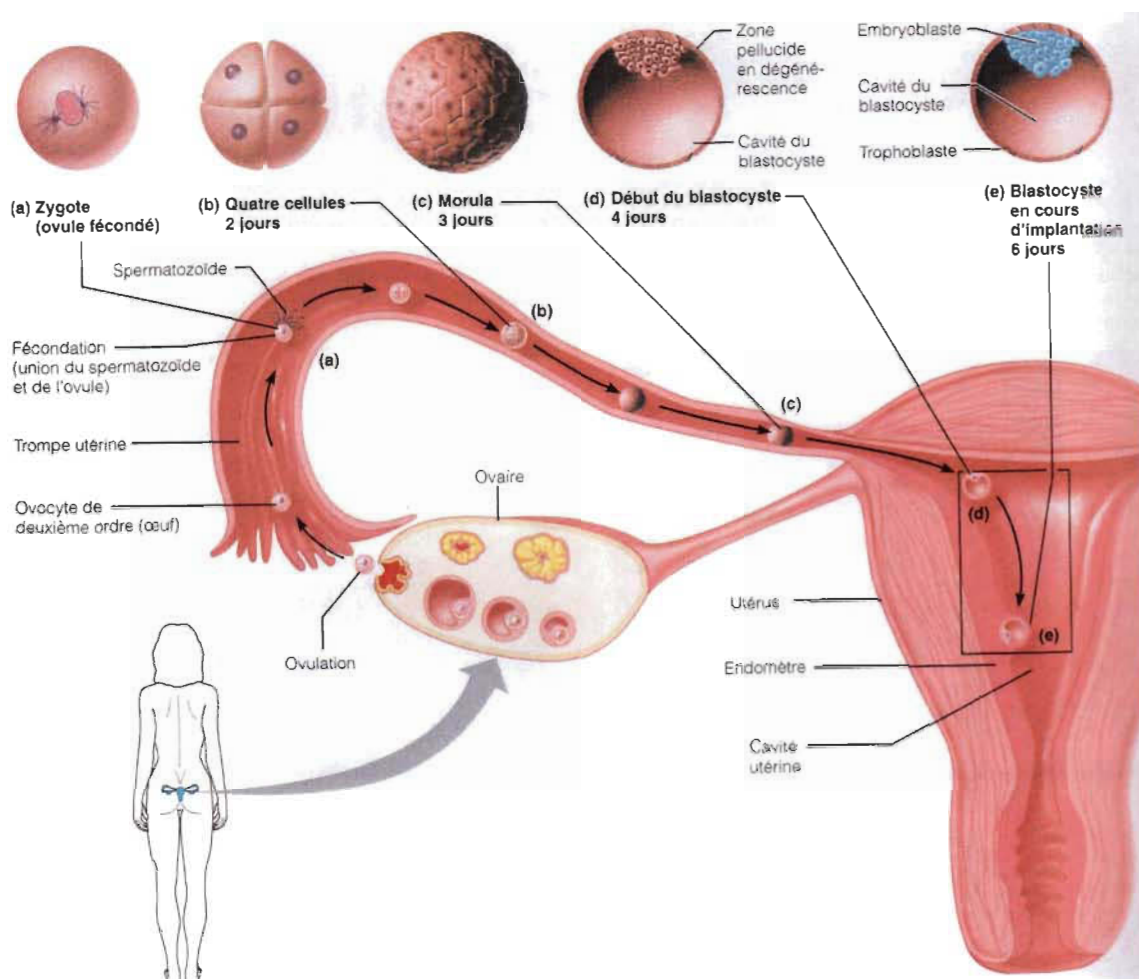
Deux autres hormones sont aussi impliquées dans le système reproducteur féminin. Il s'agit de la relaxine et de l'inhibine. De petites quantités de relaxine, une hormone peptidique produite par le corps jaune durant chaque cycle, vont relaxer l'utérus en inhibant les contractions du myomètre. Ainsi, l'implantation d'un ovule fécondé se produit dans un utérus où les contractions sont faibles ou inhibées. Pendant la



grossesse, le placenta va produire beaucoup plus de relaxine et va continuer de relaxer les muscles lisses de l'utérus. À la fin de la grossesse, elle va aussi augmenter la flexibilité de la symphyse pubienne et va aider à dilater le col utérin, ce qui permet la sortie du bébé [2].

L'inhibine est une hormone peptidique ou glycoprotéine qui est sécrétée par les cellules granuleuses de follicule en développement et par le corps jaune après l'ovulation. Cette dernière inhibe la sécrétion de FSH et en moindre mesure la LH [2].

## 1.4 Implantation embryonnaire



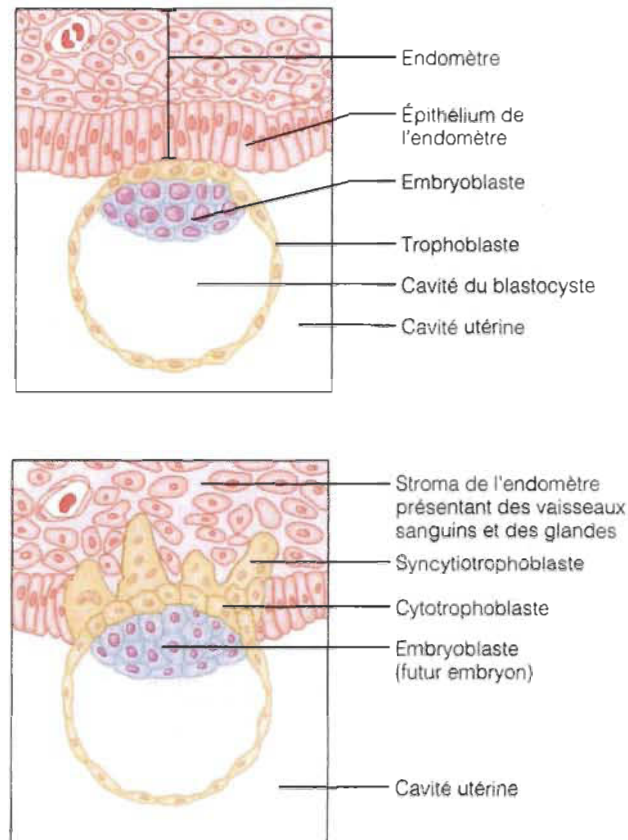
**Figure 1.5 Développement préembryonnaire : du zygote au blastocyste.**  
**Schéma présentant les différentes étapes du développement préembryonnaire et les jours correspondants à ces étapes.**  
 Tirée de [4].

L'implantation est une étape critique pour l'établissement d'une grossesse puisqu'il doit y avoir un synchronisme parfait entre le cycle ovarien (développement et maturation adéquate de l'ovocyte) et le cycle menstruel (préparation de l'endomètre à être réceptif à l'ovule fécondé). C'est pourquoi une erreur survenant dans l'un ou l'autre de ces deux processus peut compromettre l'établissement de la grossesse. Il est donc important de bien connaître les étapes de l'implantation pour pouvoir comprendre les différentes causes d'échec de ce processus lors d'une grossesse.



La fertilisation de l'ovule par un spermatozoïde survient dans le tube utérin 12 à 24 heures après l'ovulation. L'union des pronucléus mâle et femelle produit un noyau diploïde ( $2n$ ) de 46 chromosomes. L'ovule fécondé va alors s'appeler un zygote. Après la fertilisation, le zygote va subir des divisions cellulaires mitotiques très rapides, appelées le clivage ou segmentation. La première division du zygote commence 24 heures après l'union des pronucléus et prend 6 heures à se compléter. Chaque division subséquente prend un peu moins de temps. À partir du deuxième jour après la fertilisation, le second clivage est complété et on retrouve quatre cellules. À la fin du jour 3, il y a 16 cellules. À ce stade, les cellules seront appelées les blastomères (Figure 1.5). Par la suite, les clivages vont former une sphère solide appelée morula, qui est toujours entourée par la zone pellucide et conserve la même grosseur que le zygote original. À la fin du jour 4, le nombre de cellules dans la morula augmente pendant qu'elle continue à se déplacer dans le tube utérin vers la cavité utérine. Quand la morula entre dans la cavité utérine au jour 4 ou 5, une sécrétion riche en glycogène provenant des glandes de l'endomètre converge de la cavité utérine vers l'intérieur de la morula au travers la zone pellucide. Ce fluide, appelé lait utérin, rempli de nutriments, s'entrepouse dans le cytoplasme des blastomères dans la morula et permet de le nourrir. Au stade 32 cellules, le fluide entré dans la morula, s'entrepouse entre les blastomères, et les réorganisent autour d'une cavité fluidique qui sera nommée la cavité blastocyste ou blastocèle.

Une fois cette cavité formée, la masse de cellules sera appelée blastocyste. Cette structure comprend une couche de cellules périphériques appelée trophoblaste, une masse cellulaire interne nommée embryoblaste et la cavité liquidienne [8] (Figure 1.5).



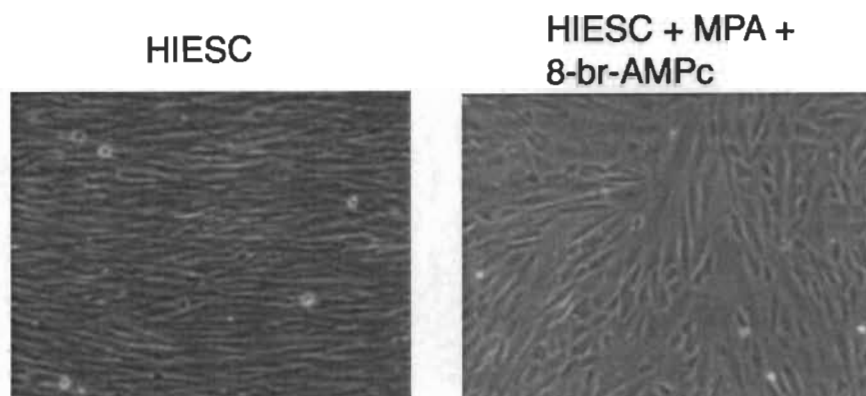
**Figure 1.6 Implantation du blastocyste.**  
**Schéma présentant le processus d'implantation du blastocyste dans la muqueuse utérine.**  
 Tirée de [4].

Le blastocyste demeure libre dans la cavité utérine environ deux jours avant son attachement aux parois utérines. À ce moment, l'endomètre est dans sa phase sécrétoire. Six jours après la fertilisation, le blastocyste commence à s'attacher à l'endomètre, ce qui débute l'implantation. Normalement, le blastocyste s'implante dans la portion postérieure du fundus ou dans le corps de l'utérus et est orienté avec la masse interne de cellules vers l'endomètre. L'attachement est la première étape de l'implantation et est caractérisé par une apposition étroite et une adhérence des cellules trophoblastiques du blastocyste aux cellules de l'épithélium endométrial de surface. Pour que cette étape survienne, la zone pellucide qui s'interpose entre ces tissus doit être éliminée, soit par les cellules trophoblastiques elles-mêmes ou par des sécrétions utérines. Chez l'humain, l'implantation est dite invasive, c'est-à-dire que le zygote érode la surface épithéliale

pour envahir le stroma sous-jacent. Lors de la phase d'attachement, on observe une réaction de perméabilisation vasculaire au niveau de la zone stromale sous-jacente au blastocyste, accompagnée d'un œdème, de modifications locales de la matrice intercellulaire et de la morphologie des cellules du stroma, ainsi que d'une multiplication de capillaires au même endroit. Cette réaction stromale est appelée réaction déciduale primaire. Au bout de 2 à 3 jours, la réaction déciduale se poursuit et sera appelée la décidualisation. Cette dernière s'étend pour former une aire déciduale secondaire. Cette partie de l'endomètre deviendra la composante endométriale principale du placenta. Quelques heures après l'attachement, l'épithélium de surface sous-jacent au conceptus est érodé. Les prolongements trophoblastiques se glissent littéralement entre les cellules épithéliales avant de les isoler, les lyser et les digérer. Quelques cellules trophoblastiques fusionnent pour former un syncytium (syncytiotrophoblaste), tandis que d'autres gardent leur individualité (cytotrophoblaste) et servent de source proliférative dans la production de tissu trophoblastique additionnel (Figure 1.6). Les tissus glandulaires endométriaux et déciduaux adjacents au trophoblaste invasif seront détruits et vont libérer des substrats métaboliques essentiels (lipides, glucides, protéines et acides nucléiques) qui seront utilisés dans la croissance du conceptus. Le tissu décidual fonctionne donc comme un vaste réservoir vitellin. La formation de même que l'invasion de la caduque ou tissu décidual sont les étapes qui terminent l'implantation. Ce tissu permet un ancrage physique en plus d'être une source nutritionnelle. Cela constitue la base du développement placentaire, par laquelle s'établit les échanges métaboliques entre les deux circulations contigües [2]. Sept jours après la fertilisation, le blastocyste s'attache plus fermement à l'endomètre, les glandes endométriales dans les environs grossissent et l'endomètre devient plus vascularisé. Le blastocyste va éventuellement sécréter des enzymes et s'enfuir dans l'endomètre et va devenir entouré par ce dernier. Suivant l'implantation, l'endomètre est appelé la caduque. Celle-ci se sépare de l'endomètre après la naissance, comme cela survient lors des menstruations. Différentes régions de la caduque sont nommées selon leur position par rapport au site d'implantation. La caduque basale est la portion de l'endomètre entre l'embryon et la couche basale de l'utérus, elle fournit une grande quantité de glycogène et de lipides pour l'embryon en développement et le fœtus et va devenir la partie maternelle du

placenta. La caduque capsulaire est la portion de l'endomètre situé entre l'embryon et la cavité utérine. La caduque capsulaire est le reste de l'endomètre qui tapisse les régions non impliquées de l'utérus [4].

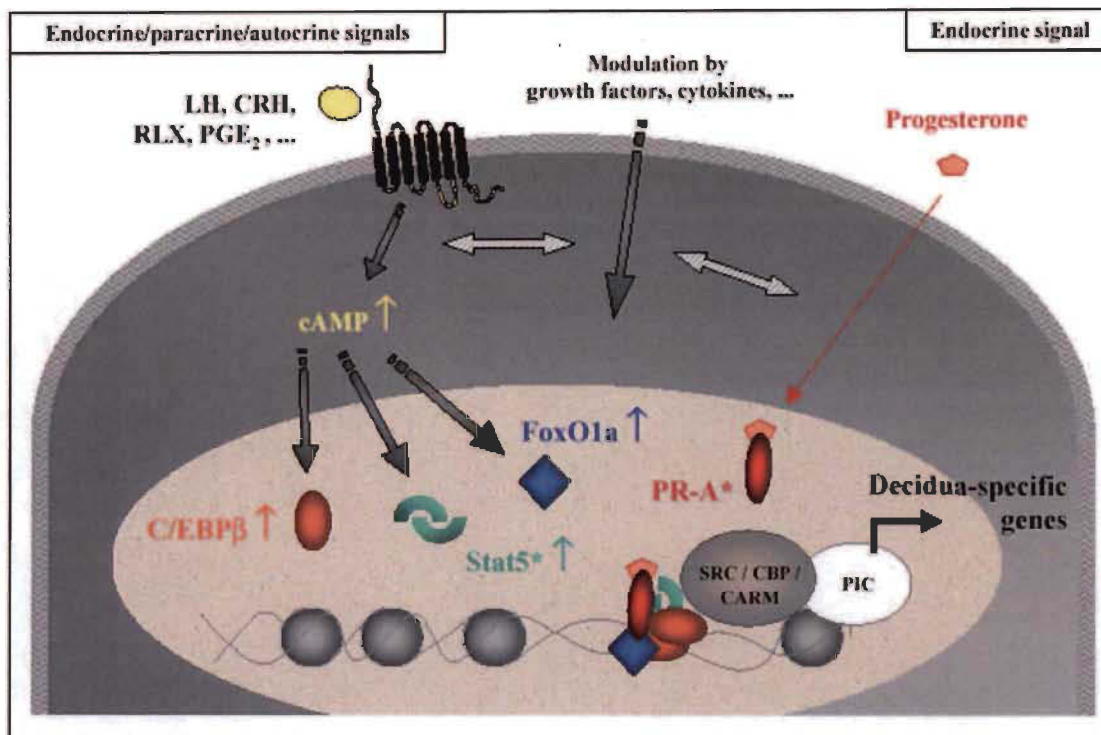
### 1.5 La décidualisation



**Figure 1.7** Changement morphologique observée chez les cellules HIESC lors de l'induction de la décidualisation *in vitro* par le MPA et le 8-br-AMPc.  
**HIESC** : Human immortalized endometrial stromal cell  
**MPA** : medroxyprogesterone acetate  
**8-br-AMPc** : 8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate  
 Tirée de [3].

L'interaction entre l'embryon et l'endomètre maternelle est primordiale pour l'établissement d'une grossesse et pour le bon développement de l'embryon. Ainsi, l'endomètre maternel va s'adapter pour créer un environnement adéquat à l'implantation embryonnaire. Cette adaptation débute par la prolifération des cellules endométriales pendant la phase proliférative grâce à l'oestrogène, puis la progestérone et l'AMPc (adénosine 3',5'-monophosphate cyclique) seront responsables de la différenciation des cellules stromales en cellules déciduales durant la phase sécrétoire [10]. La différenciation des cellules peut être observée au jour 23 du cycle menstruel. Les changements survenant dans les cellules stromales endométriales sont de types morphologique et biochimique [11]. Les cellules stromales en prolifération qui étaient auparavant de type fibroblastique et allongées vont alors s'élargir, s'arrondir et peuvent

même devenir binucléées [12] (Figure 1.7). De plus, elles pourront alors sécréter des lipides et du glycogène dans le but de nourrir le conceptus en attente d'un placenta fonctionnel. Ces changements morphologiques surviennent en particulier autour des artères spiralées de l'endomètre.



**Figure 1.8** Coopération entre les deux voies de signalisation impliquées dans la décidalisation.

Le schéma présente sommairement les voies de signalisation déclenchées par la LH et la progestérone et leur coopération dans l'induction des gènes cibles de la décidalisation.

Tirée de [13].

L'AMPc serait le principal agent responsable de la décidalisation puisque son pouvoir à sensibiliser les cellules stromales endométriales à l'action de la progestérone a été montré dans différentes études [14]. De plus, diverses études montrent que les gonadotrophines (FSH, LH et hCG) induisent la production de l'AMPc et que ce dernier peut alors induire le phénotype de décidalisation par le changement morphologique et la sécrétion de prolactine. Aussi, l'utilisation de MPA (medroxyprogestérone acetate), un analogue de la progestérone, a un effet synergique avec l'AMPc sur la production de



prolactine. En effet, administré en même temps que l'AMPc, le MPA augmente la production de prolactine, tandis que le MPA seul ne parvient pas à produire un niveau similaire de prolactine [15, 16]. La progestérone seule induira une décidualisation, mais cela nécessitera beaucoup plus de temps que lorsqu'une forte concentration d'AMPc est présente. Des expériences d'invalidation génique (aussi appelé knockout) ont montré que les hormones et leurs récepteurs respectifs sont essentiels pour l'établissement de la décidualisation. En effet, une invalidation génique du récepteur à la progestérone (PRKO) chez les souris montrait des souris avec un utérus non réceptif et qui était réfractaire au stimulus décidual artificiel. Ainsi les souris PRKO ne peuvent supporter l'implantation embryonnaire. Également, les souris ayant subi une invalidation génique pour le gène ER $\alpha$  (estrogen receptor alpha) ont une mauvaise croissance utérine et échouent à préparer l'attachement du blastocyste [17, 18]. On voit alors que les hormones et leurs récepteurs respectifs impliqués dans la décidualisation sont essentiels et que la décidualisation doit s'opérer pour l'établissement d'une grossesse. De plus, en cas d'implantation, la transformation stromale va s'étendre jusqu'aux régions périvasculaires et plus encore ce qui est bénéfique pour renforcer l'implantation [19]. Il est également possible de confirmer le processus de décidualisation en mesurant l'expression de gènes transcrits spécifiquement lors de son induction comme la prolactine, WNT4 (wingless-type MMTV integration site family, member 4) et IGFBP1 (insulin-like growth factor-binding protein 1). Ces derniers sont alors appelés des marqueurs de décidualisation [11, 20, 21].

Les acteurs de la décidualisation agiront de façon différente, mais complémentaire pour induire la décidualisation des cellules stromales endométriales. D'abord, différentes substances peuvent augmenter la concentration en AMPc dans les cellules stromales endométriales comme, PGE2 (prostaglandine E2), hCG, FSH, LH et la relaxine [22-25]. Ces substances ne fonctionnent pas toutes de la même façon en réponse à l'AMPc, mais plusieurs d'entre elles utilisent la voie de signalisation PKA (protein kinase A) [26, 27]. Quand cette voie est activée par un ligand, l'adénylate cyclase génère de l'AMPc, lequel va se fixer aux sous-unités R (régulatrice) de PKA. Cette dernière est formée par deux sous-unités R, une sous-unité C1 (catalytique) et une sous-unité C2 (calmoduline). La

liaison de deux molécules d'AMPc aux sous-unités R provoque un changement de conformation dans le dimère formé par les sous-unités R, ce qui les dissocie des sous-unités C. Ensuite, les sous-unités C libérées vont migrer dans le noyau des cellules et phosphoryler leurs cibles qui sont CREB (cAMP response element (CRE)-binding protein) et CREM (cAMP responsive element modulator) [28]. Il est important de savoir que le promoteur de dPRL (decidual prolactin) contient une séquence CRE (TGACGTTT). C'est de cette façon que l'AMPc serait en mesure d'augmenter la production de la prolactine déciduale lors de l'induction de la décidualisation. De plus, une forte concentration d'AMPc va activer des facteurs de transcription incluant FOXO1 (forkhead box O1), C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ ), STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) et HOXA10 (Homeobox A10). Ces facteurs de transcription interagissent physiquement avec le récepteur PR et le module.

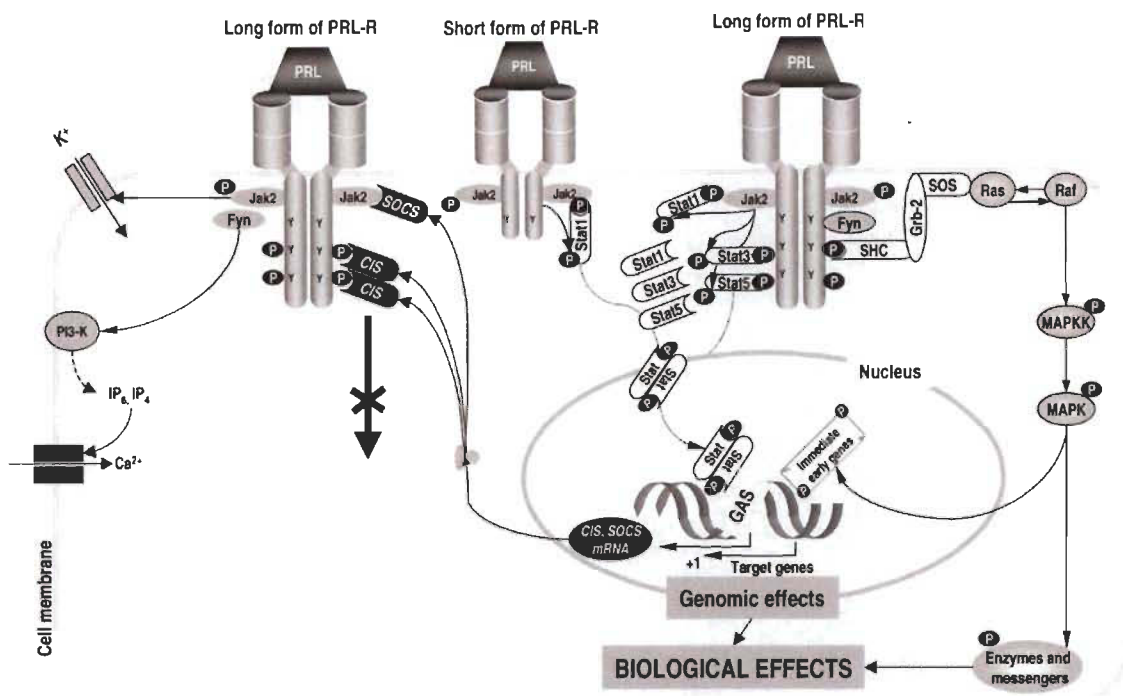
Le mécanisme d'action de la progestérone sur la décidualisation n'est pas parfaitement connu, mais on sait qu'étant une hormone stéroïdienne, la progestérone migre dans le noyau des cellules où elle s'associe avec son récepteur, soit PR-A ou PR-B. Les deux récepteurs ont des rôles différents. Il a été vu dans la littérature que PR-A serait celui responsable de la décidualisation [13]. Une fois lié à son récepteur, le complexe formé va se lier aux éléments de réponses présents sur le promoteur des gènes cibles comme la prolactine. Par contre, on sait que les promoteurs des gènes déciduaux (PRL et IGFBP1) sont activés par un complexe multimérique de facteurs de transcription qui s'assemblent en réponse aux signaux provenant des voies de signalisation déclenchées par l'AMPc et la progestérone [29]. Pour une décidualisation maximale, il est donc important que ces deux mécanismes coopèrent (Figure 1.8).

## 1.6 Les marqueurs déciduaux

Les marqueurs déciduaux, dont prolactine et IGFBP1 font partie sont des gènes transcrits seulement lorsqu'il y a induction de la décidualisation. Ainsi, leur présence permet de confirmer que la décidualisation a bel et bien eu lieu en plus de refléter son pourcentage d'induction. En effet, une diminution des niveaux de transcription de ces

marqueurs comparés à la situation normale nous démontre que la décidualisation est négativement affectée. La prolactine est une hormone peptidique lactotrope et mammosomatotrope de l'adénohypophyse hautement conservée. Il existe 97 % d'homologie entre la prolactine hypophysaire de macaque et celle de l'homme, ce taux baisse à 62 % lorsque comparé avec celle chez le rat [30]. Cette hormone peut avoir différentes actions biologiques puisqu'elle peut subir différentes modifications post-traductionnelles comme, l'oligomérisation, le clivage, la glycosylation, la phosphorylation et la sulfatation [31]. L'adénohypophyse représente le principal lieu de synthèse de la prolactine. Toutefois, la PRL a aussi été mise en évidence chez la femme dans l'endomètre utérin, le myomètre et le placenta, où elle représente la plus grande source de PRL non hypophysaire, qui sera alors appelée PRL déciduale [30]. La production de PRL varie selon l'espèce animale. En ce qui concerne l'espèce humaine, les niveaux plasmatiques de PRL sont en moyenne de 8 ng/mL chez la femme et ces niveaux varient selon l'état physiologique et l'avancement du cycle menstruel. Au cours du cycle menstruel, les niveaux de PRL sont corrélés à ceux de l'estradiol et augmentent au moment du pic ovulatoire. Pendant la grossesse, les taux de PRL augmentent considérablement, pour atteindre des valeurs de 200 à 300 ng/mL. Chez tous les mammifères au moment de la délivrance on observe un pic de PRL qui se renouvelle à chaque tétée. D'ailleurs, l'induction de la libération de PRL adénohypophysaire par la tétée permet de maintenir la lactation [30].





**Figure 1.9 Schéma des différents récepteurs de PRL ainsi que leurs mécanismes conduisant à leurs effets biologiques**  
Tirée de [31].

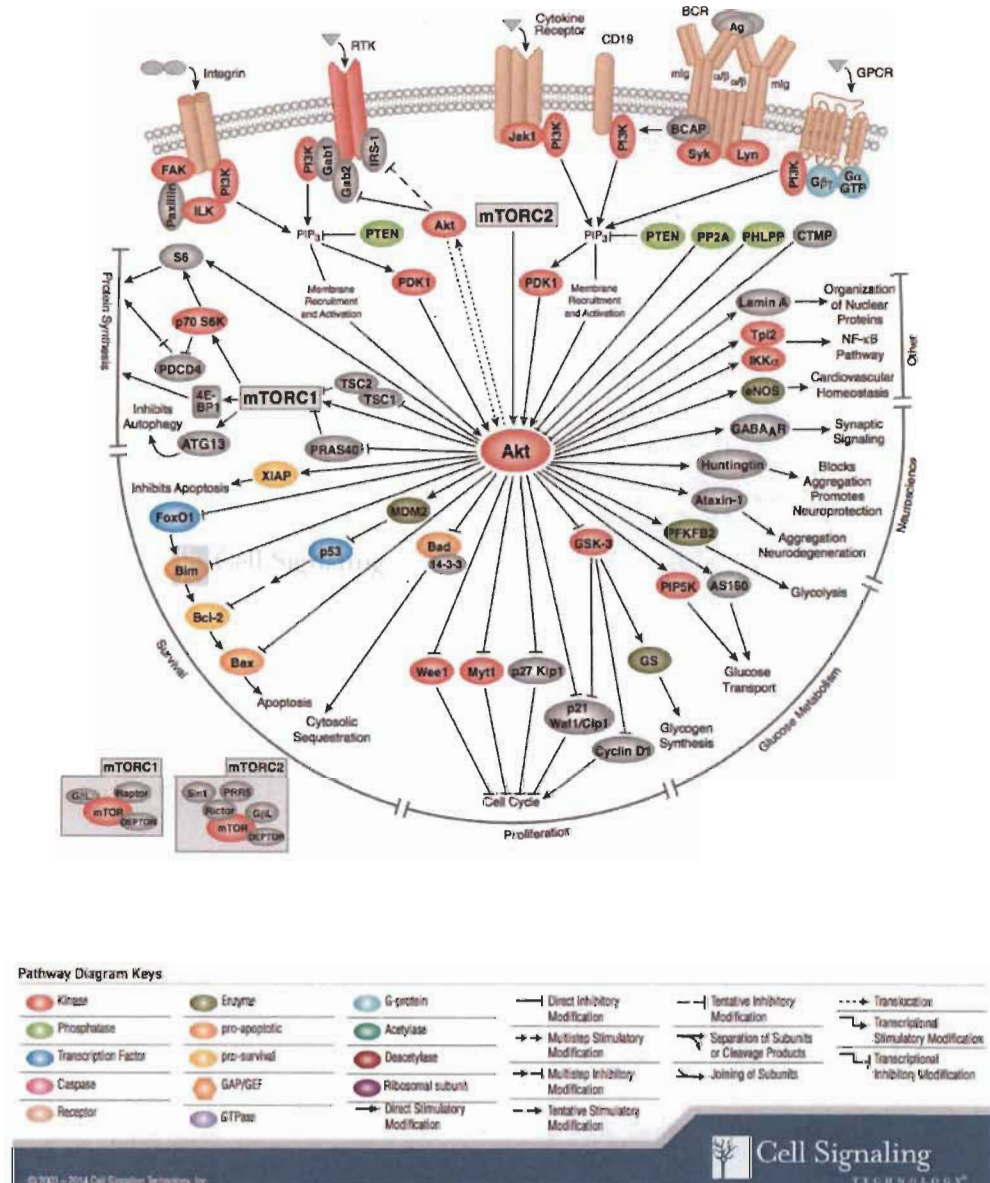
L'action de la PRL sur la reproduction se fait à plusieurs niveaux [32]. En effet, elle a une action centrale en agissant sur le système nerveux central. À ce niveau, elle pourrait inhiber la sécrétion hypothalamique de la GnRH. Son action sur les ovaires s'observe d'une part par une accumulation de la PRL dans le liquide folliculaire au cours de la maturation des follicules. La maturation des follicules est alors affectée, car la PRL inhibe la production d'estradiol. Cette inhibition survient étant donné que la PRL régule négativement l'activité de l'aromatase qui elle est stimulée par la FSH [32]. De plus, les effets de la PRL sur la formation et le maintien du corps jaune sont multiples. D'abord, la présence de PRL maintient les taux de récepteurs de la LH et de l'estradiol dans les cellules de la granulosa chez la ratte [30]. Aussi, elle participe au développement du corps jaune en favorisant la synthèse protéique totale dans les cellules lutéales. En effet, la PRL induit la déphosphorylation du facteur d'élongation (EF2), ce qui cause la translocation des ARN de transfert vers les ribosomes et active le processus d'élongation peptidique. Également, la PRL stimule la production de progestérone. Elle y arrive en

augmentant la synthèse des récepteurs des HDL (high density lipoprotein), en stimulant l'activité d'un enzyme responsable de la synthèse du cholestérol (cholestérol estérase), en plus de stimuler l'activité de l'enzyme responsable de la conversion de la pregnénolone en progestérone ( $\beta$ -ol-deshydrogénase). La PRL intensifie son effet sur la progestérone en inhibant l'expression du gène de la 20  $\alpha$ -HSD. Ce dernier est responsable de la conversion de la progestérone en son dérivé 20 $\alpha$  hydroxylé qui lui est inactif chez les mammifères [30].

Les récepteurs de la PRL existent sous des formes courtes et longues, de même que des formes de taille intermédiaire ou soluble [31]. La présence de différentes formes et structures possibles des récepteurs pourrait expliquer les actions biologiques diverses de la PRL. Les récepteurs ayant une forme longue ou intermédiaire sont capables d'induire la différenciation des cellules épithéliales mammaires, tandis que les formes courtes agiraient au contraire comme régulateurs négatifs de la différenciation. Pour transmettre son signal, la PRL doit d'abord se fixer au récepteur. Par la suite, la fixation de l'hormone induit une dimérisation du récepteur. Ce changement de conformation du récepteur permet de rapprocher des domaines cytoplasmiques qui provoquent la phosphorylation de la tyrosine kinase JAK2 [31]. Cette dernière est associée au récepteur de PRL. Une fois activé, JAK2 phosphoryle le récepteur, créant des sites potentiels de fixation pour les protéines de signalisation contenant des domaines SH2 (src homology 2) comme les STATs (signal transducers and activators of transcription). Une fois fixés, les STATs sont phosphorylés par JAK2, puis se dissocient et forment des dimères. Ces derniers se dirigent et pénètrent dans le noyau où ils vont induire la transcription de gènes cibles par leur liaison à des séquences spécifiques de leurs promoteurs (Figure 1.9). Outre les STATs, la PRL peut aussi phosphoryler et activer des kinases. Parmi ces kinases se retrouvent, les IRS1 et IRS2 (Insulin receptor substrate 1 et 2). Une fois phosphorylés, les IRS recrutent des protéines à domaine SH2, comme la kinase phosphatidyl-inositol-3 (PI3K). Également, la PRL permet l'activation de multiples protéines. Parmi celles-ci se retrouvent : Shc, Grb2, SOS, Ras, Raf, MAPKK et la sérine/thréonine kinase MAPK, qui ont un rôle général dans la prolifération. Finalement, PRL favorise l'entrée de calcium dans la cellule en ouvrant un canal

calcique. L'ouverture de ce canal dépend d'une hyperpolarisation de la membrane cellulaire. L'hyperpolarisation de la membrane est causée par l'ouverture d'un canal potassique induite par la phosphorylation par JAK2 [30] (Figure 1.9).

## 1.7 Voie de signalisation PI3K/Akt



**Figure 1.10 Voie de signalisation PI3K/Akt**

Le schéma présente l'activation d'Akt et ses différents substrats de même que ses principaux rôles associés.

Tirée

de :

[http://media.cellsignal.com/www/pdfs/science/pathways/Akt\\_PKB.pdf](http://media.cellsignal.com/www/pdfs/science/pathways/Akt_PKB.pdf)

Akt/PKB (protein kinase B) a été découvert comme étant l'homologue humain de l'oncogène viral *v-Akt* [33]. Cet oncogène est connu pour causer une forme de leucémie

chez la souris. Par la suite, d'autres études ont montré que *v-Akt* et son homologue humain encodait une protéine avec beaucoup de similarités entre PKC et PKA, d'où son nom, PKB [34, 35]. La voie de signalisation PI3K/Akt est connue pour ses rôles de prolifération et de survie cellulaire principalement, mais il possède aussi des rôles au niveau de la croissance, le métabolisme, l'angiogenèse et la transformation maligne [34]. Pour ces raisons, la cascade de signalisation PI3K/Akt constitue une voie de signalisation ayant une forte prévalence de lésion génétique dans les cellules et les tissus.

L'activation de cette voie et l'augmentation quantitative de la protéine Akt sont détectées dans plusieurs types de cancers comme, les cancers gastriques, les cancers du sein, de la prostate, des ovaires et des tumeurs au cerveau [36]. Akt peut donc causer divers cancers dus à ses différents rôles, mais aussi parce que Akt est présent en trois isoformes différentes qui partagent un fort degré d'homologie (80 %) au niveau des acides aminés. Ces trois isoformes sont d'ailleurs exprimées dans presque tous les organes. Ces isoformes sont, Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) et Akt3 (PKB $\gamma$ ) [37, 38]. Les deux premières isoformes sont exprimées dans tous les tissus, tandis que l'isoforme Akt3 est exprimée dans des tissus spécifiques et est abondante dans les tissus neuronaux [39-41]. Akt est composé de trois régions distinctes; le domaine d'homologie PH en N-terminale, un domaine catalytique centrale et un motif hydrophobique en C-terminale [37]. Le domaine PH comporte un site de liaison pour les PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) et PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate), ce qui permet le recrutement d'Akt à la membrane. Cet événement est essentiel pour l'activation d'Akt. Le domaine C-terminale permet aussi de réguler Akt étant donné qu'il contient un site de liaison pour les kinases activatrices PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1).

Les trois isoformes sont activées par un mécanisme semblable dans la signalisation de la PI3K. La PI3K est activée par des récepteurs tyrosine-kinase (RTK) et couplée à une protéine G. Premièrement, l'activation des RTK débute lorsqu'un ligand s'y fixe. Ces récepteurs sont composés de trois domaines; le domaine extracellulaire,



transmembranaire et l'intracellulaire et sont situés au niveau de la membrane [37]. Le domaine extracellulaire est le domaine où le ligand se fixe. Les ligands pouvant s'y lier sont des facteurs de croissance comme, IGF (Insulin-like growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor), EGF (Epidermal growth factor)) et des cytokines dont les interleukines (1, 2, 3, 4 et 6) [42]. La fixation du ligand cause le rapprochement de deux récepteurs, s'en suit leur dimérisation et leur activation par transphosphorylation de leur partie intracellulaire. Suite à l'activation, la partie intracellulaire des récepteurs peut servir d'ancrage à d'autres protéines, comme p85, la sous-unité régulatrice de PI3K, la kinase intracellulaire responsable de l'activation d'Akt [43] (Figure 1.10).

PI3K est constituée en plus de la sous-unité régulatrice p85, une sous-unité catalytique, p110 [44]. Ces deux différentes sous-unités lui permettent alors d'être activée directement par un récepteur tyrosine-kinase ou par l'intermédiaire de la protéine RAS. L'inhibition de la PI3K se fait par PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) [37]. Cette dernière permet la déphosphorylation de PIP3 et PIP2 en position D3, ce qui diminue la quantité de lipides pouvant lier Akt. À l'inverse, après stimulation d'un récepteur tyrosine-kinase par un ligand, la PI3K va phosphoryler les phosphoinositide en position D3 pour générer les PIP2 et PIP3. Ce dernier (PIP3) lit le domaine PH en N-terminal sur Akt et va ainsi permettre son recrutement à la membrane. L'activation des isoformes d'Akt se fait la phosphorylation sur deux résidus clés. La PDK1 est une sérine/thréonine kinase contenant aussi un domaine PH en C-terminale, ce qui lui permet de se lier aux PIP3 et donc d'être à proximité de sa cible (Akt). Ainsi, PDK1 va phosphoryler le résidu thréonine dans la boucle d'activation du domaine catalytique (Thr 308 pour Akt1, Thr309 pour Akt2 et Thr305 pour Akt3) [38]. Le résidu sérine dans le domaine hydrophobique d'Akt est lui phosphorylé par le complexe mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) (Ser473 pour Akt1, Ser474 pour Akt2 et Ser472 pour Akt3) [45]. La phosphorylation de la thréonine cause un changement conformationnel qui permet la liaison de substrats. D'autres sites de phosphorylation ont été identifiés, mais ne semblent pas affecter son activation, comme les sites S124 et T450. Une fois phosphorylé sur les deux résidus, Akt se dissocie de PIP3 et va migrer dans d'autres compartiments cellulaires incluant le noyau, la

mitochondrie et d'autres organelles [46]. Akt peut ainsi transduire le signal en phosphorylant de nombreux substrats comme GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3), BAD (Bcl-2-associated death promoter), MDM2 (mouse double minute 2 homolog) et FOXO (FoxO subfamily transcription factors) (Figure 1.10).

Akt agit en reconnaissant et en phosphorylant des séquences consensus RXXXX(S/T) qui sont entourées par des résidus hydrophobiques [46]. Puisque cette séquence est présente dans beaucoup de protéines, Akt possède de nombreux substrats. Jusqu'à présent, plus de 100 protéines ont été identifiées comme étant des substrats des trois isoformes d'Akt. Akt peut donc jouer des rôles très variés en phosphorylant des substrats particuliers. Par exemple, en phosphorylant le facteur de transcription FOXO, cela induit son transport hors du noyau, ce qui empêche la transcription de gènes pro-apoptotiques [47]. Aussi, Akt peut réguler négativement l'apoptose en phosphorylant et en inactivant des protéines pro-apoptotiques comme BAD, qui contrôle la libération du cytochrome c de la mitochondrie [48]. La phosphorylation de BAD induit l'association de la protéine 14-3-3, sa dissociation de Bcl2 et ainsi l'activation d'Akt sert de signal de survie cellulaire (Figure 1.10).

De plus, Akt peut phosphoryler IKK ce qui augmente indirectement l'activité du NF- $\kappa$ B et stimule alors la transcription de gènes de survie cellulaire [49]. Akt cible aussi mTOR (mammalian target of rapamycin) par au moins deux mécanismes différents qui agissent de façon directe et indirecte. Le mécanisme direct est par phosphorylation de mTOR tandis que le mécanisme indirect est en phosphorylant et en inactivant TSC2 (tuberous sclerosis complex-2) [46]. La protéine mTOR peut aussi être régulée par l'état nutritionnel de la cellule. Cette protéine est une enzyme intracellulaire avec une activité sérine-thréonine kinase. L'activation de mTOR se fait lorsqu'elle est associée à d'autres protéines au sein des complexes multiprotéiques. Il existe deux types de complexes contenant la protéine mTOR. Les deux complexes diffèrent selon la protéine qui est associée à mTOR. Dans le complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), mTOR est associé à RAPTOR (regulatory-associated protein of mTOR) et dans le complexe mTORC2, elle est associée à RICTOR (rapamycin-insensitive



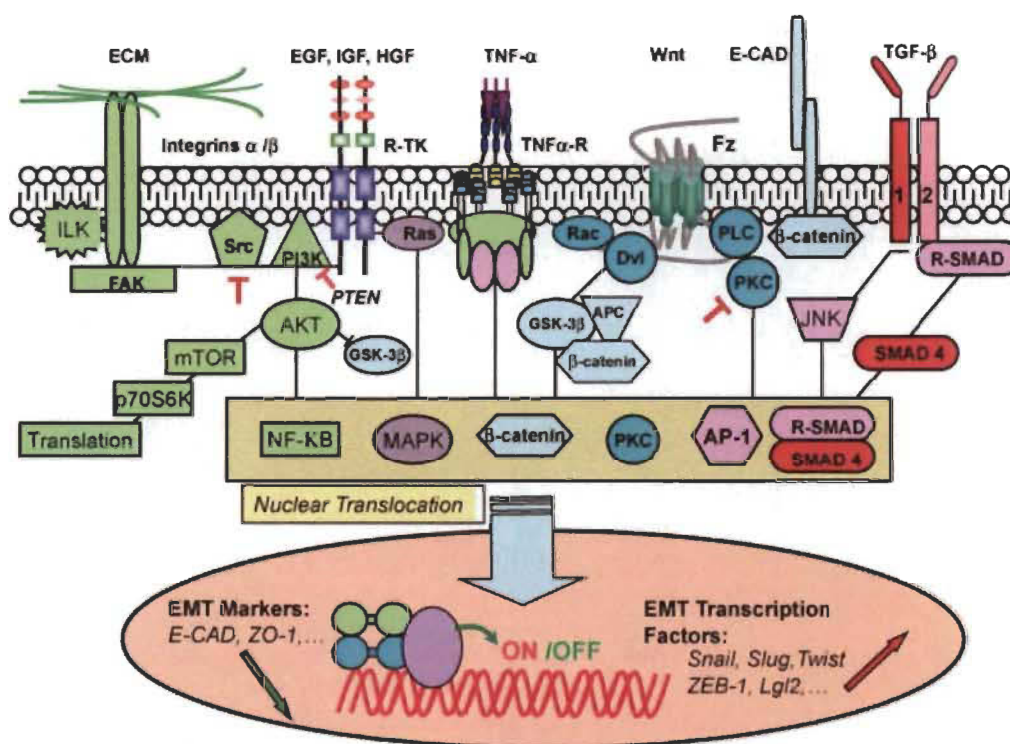
companion of mTOR). Compte tenu de la composition du complexe, on comprend que le complexe mTORC1 est celui qui est inhibé par la rapamycine [46]. Il est connu que la protéine mTOR joue différents rôles. Ses rôles sont exercés selon les cibles protéiques qui seront activées ou inhibées. Par exemple, elle peut stimuler la traduction et la synthèse protéique, le cycle cellulaire, l'apoptose et peut influencer le cytosquelette.

Les différents rôles des isoformes d'Akt ont été révélés par des expériences d'inactivation génique (knockout) pour chacune de ses isoformes. Ainsi, des souris knockout pour Akt1 ont montré un retard de croissance [50], les knockout Akt2 ont développé un diabète résistant à l'insuline [51] et les knockout Akt3 avaient une réduction de la taille du cerveau [52].

Il existe différents inhibiteurs pouvant contrer les effets d'Akt, puisque celui-ci est dérégulé dans de nombreux cancers [53]. Ainsi, son inhibition permet dans certains cas de ralentir la progression ou même de faire régresser une tumeur. Il existe des inhibiteurs pour la PI3K qui sont le LY294002 et le Wortmannin. Ces deux inhibiteurs ciblent la sous-unité catalytique p110 de PI3K [46]. L'utilisation de ces inhibiteurs *in vitro* a permis de sensibiliser des cellules cancéreuses à divers agents chimiothérapeutiques. Par contre, ces inhibiteurs sont peu solubles et hautement toxiques donc ils ne peuvent être utilisés en clinique. Il existe aussi des inhibiteurs ciblant les isoformes d'Akt directement comme la Perifosine, les PIA (phosphatidylinositol ether lipid analogs) et la Triciribine. *In vitro*, la perifosine inhibe la translocation d'Akt à la membrane cellulaire, ce qui permet de diminuer son activation [54]. Cet agent permet de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose et à l'arrêt du cycle cellulaire induit par la radiation *in vitro* et *in vivo*. Les PIA sont des analogues lipidiques des phosphatidylinositol. Ils sont construits pour interagir avec le domaine PH des isoformes d'Akt, tout en étant structuralement similaires aux produits de la PI3K [55]. Finalement, le Triciribine inhibe la phosphorylation d'Akt2 aux sites T309 et S474 et inhibe la phosphorylation induite par l'EGF pour chacun des isoformes d'Akt *in vitro* et *in vivo* [56]. De plus, étant donné qu'un des substrats le plus souvent phosphorylés par Akt est mTOR, certains inhibiteurs

sont utilisés pour bloquer la voie PI3K/Akt/mTOR plus loin, en inhibant mTOR. L'inhibiteur de mTOR le mieux connu est la rapamycine (Figure 1.10).

### 1.8 Transition épithéliale à mésenchymale (TEM)



**Figure 1.11** Voies de signalisation affectant la TEM  
Schéma présentant les différents facteurs de transcription induisant la TEM, de même que les différents marqueurs de TEM.  
Tirée de [57]

Lors de la TEM, les cellules épithéliales acquièrent des propriétés fibroblastiques, présentent une adhésion cellulaire réduite et une augmentation de la motilité [58]. Ces propriétés facilitent la sortie des cellules cancéreuses de la tumeur solide. Ainsi, les tumeurs subissent d'abord la TEM, ce qui permet aux cellules d'acquérir un phénotype invasif et métastatique. Ensuite, les cellules mésenchymateuses cancéreuses vont subir la transition inverse, soit la TME, aux sites des métastases et vont correspondre à la tumeur primaire [59].

Un des évènements marquants de la TEM est la diminution de E-Cadhérine et ainsi la réexpression de la E-Cadhérine sera une caractéristique de la TME [58]. Une autre caractéristique épithéliale est l'expression de kératine-18. L'adhésion médiée par les cadhérines est un élément crucial de la détermination et le maintien du phénotype épithélial. De plus, il a été montré que E-Cadhérine seule peut induire la TME [60] (Figure 1.11).

Ainsi pour connaître l'état phénotypique des cellules, l'expression de certains marqueurs caractéristiques sont mesurés. Parmi ces marqueurs, on retrouve des facteurs de transcription incluant des protéines avec doigts de zinc des familles Snail et Twist, comme dEF1/ZEB1/TCF8 et S1P1/ZEB2/ZFH1B. Ces dernières sont associées à une répression de la E-Cadhérine [61]. Snail peut reconnaître et lier le E-box (5'-CACCTG-3') et supprimer l'expression de E-Cadhérine [62]. Slug appartient à la même famille de facteurs de transcription que Snail et leurs structures et fonctions sont semblables [63]. Ainsi, Slug peut induire la TEM dans les cellules épithéliales adultes [64]. Lors de la TME, on peut observer une diminution des marqueurs de TME comme ZEB1, Slug, Snail, vimentine SMA ou Twist [65-68] et une augmentation des marqueurs TME comme E-Cadhérine et kératine [68]. On sait aussi que la progestérone peut réguler Snail et d'autres protéines induisant la TEM et induire la TME via le récepteur membranaire à la progestérone A (PR-A) [69] (Figure 1.11).

L'inhibition de SHP2 (Src Homology Phosphatase 2) supprime l'activation des voies de signalisation RAS/ERK et PI3K/Akt induit par EGF (endothelial growth factor), ce qui induit le changement morphologique des cellules d'une tumeur du sein vers la forme épithéliale. De plus, une augmentation de E-Cadhérine et de fibronectine et une diminution de vimentine est observée [70]. Ainsi, on remarque qu'une diminution de la voie de signalisation d'Akt pourrait conduire à un phénotype TME. Aussi, on observe la TME avec des traitements à la progestérone [69]. De même, une inhibition de l'activité d'Akt par le PIA diminue la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B et diminue l'expression de Snail et Twist. De plus, un traitement au PIA induit l'expression de E-Cadhérine et  $\beta$ -catenin, diminue vimentine, restaure la morphologie épithéliale (forme

polygonale) et réduit la migration des cellules tumorales [67]. Akt semble donc être un important élément de signalisation durant les changements de phénotype des cellules et son activité est habituellement réprimée durant la TME (Figure 1.11).

## **CHAPITRE II**

### **ARTICLE SCIENTIFIQUE**

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une soumission pour publication en anglais dans la revue *Endocrinology* et est présentement en cours d'évaluation par les pairs. Le titre de l'article est : Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of human immortalized endometrial stromal cells.

#### **2.1 Contribution des auteurs**

Kathy Grenier

- Exécution des expérimentations
- Conception et analyse de toutes les expérimentations
- Écriture de l'article

François Fabi

- Aide pour la rédaction de l'article

Sophie Parent

- Planification et explication des étapes de clonage pour l'expression des isoformes d'Akt constitutivement actif dans les cellules HIESC

Valérie Leblanc

- Aide et soutien technique pour les expérimentations

Éric Asselin

- Conception et analyse de toutes les expérimentations
- Révision de l'article et du mémoire

## 2.2 Résumé de l'article

L'infertilité est en constante augmentation au Canada, où 16 % des couples en âge de procréer rencontrent des difficultés à établir et mener à terme une grossesse. Il existe plusieurs causes d'infertilité dont un grand nombre résultent d'une mauvaise communication entre l'embryon et l'endomètre maternelle.

Il est connu que l'endomètre subit cycliquement de grands changements au cours des cycles menstruels. En effet, les cellules stromales endométriales prolifèrent et se différencient pendant un processus appelé la décidualisation. Le changement morphologique rencontré lors de ce processus montre des caractéristiques similaires à la transition mésenchymato-épithéliale (TME) qui est l'opposé de la transition épithélio-méchymateuse (TEM). La diminution de l'expression de certains facteurs de transcription sont associés à la TME, comme ZEB1, Slug, Snail et Twist. Les mécanismes intracellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation de l'apoptose et dans la prolifération cellulaire pendant la décidualisation de l'endomètre ne sont pas complètement compris.

Il a été montré précédemment que la kinase Akt est impliquée dans la survie cellulaire des cellules endométriales. Cette kinase induit la survie cellulaire et agit comme régulateur de la prolifération cellulaire, la croissance, le métabolisme et l'angiogénèse. Trois isoformes d'Akt ont été identifiées et ont des rôles distincts pendant la gestation. L'objectif de cette étude est de déterminer le rôle de chaque isoforme dans la décidualisation. La décidualisation est induite à l'aide du 8-br-AMPC et du MPA et la sécrétion des protéines IGFBP1 et PRL, deux marqueurs connus de décidualisation sont mesurés pour confirmer l'induction de la décidualisation.

Nos résultats montrent que pendant la décidualisation, le niveau protéique et la phosphorylation de chaque isoforme d'Akt sont diminués. Par contre, des analyses de qRT-PCR montrent que l'expression de l'ARNm des isoformes n'est pas influencée, suggérant que la diminution protéique est un mécanisme post-traductionnelle. Nous avons aussi observé une diminution de l'expression de Slug, une diminution de la phosphorylation de mTOR et une diminution de motilité cellulaire dû à la diminution des isoformes d'Akt. Finalement, après réexpression des isoformes d'Akt constitutivement actives, nous observons une diminution des marqueurs de décidualisation.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition d'Akt est importante pour induire la TME et pour l'expression adéquate des marqueurs de décidualisation. Notre hypothèse est que les cellules décidualisées arrêtent leur prolifération pour se différencier et que la voie de signalisation Akt doit être inhibée pour permettre la différenciation. Des études additionnelles sont présentement réalisées pour comprendre les rôles spécifiques de chaque isoforme dans la décidualisation.

## 2.3 Article scientifique

### **Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of human immortalized endometrial stromal cells**

Authors and affiliations: Kathy Grenier, François Fabi, Sophie Parent, Valérie Leblanc and Eric Asselin

Department of Medical Biology, Research Group in Cellular Signaling, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada

Keywords: Akt, phosphatidylinositol 3-kinase, decidualization, mesenchymal to epithelial transition, cell motility, mTOR, Mg132

Correspondence: Eric Asselin, Department of Medical Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7. E-mail: [Eric.Asselin@uqtr.ca](mailto:Eric.Asselin@uqtr.ca)



## Abstract

Infertility is constantly increasing in Canada, where 16% of Canadian couples are experiencing difficulty conceiving. It is thought that infertility can emanate from the dysregulated communication between the embryo and the maternal endometrium. This communication is crucial to successful implantation and necessitates a receptive endometrium. In order to allow for this window of implantation to be open at the right moment, endometrial stromal cells proliferate and differentiate by a mechanism called decidualization. Decidualization is a process during which the cells undergo phenotypical changes allowing them to lose their fibroblast-like characteristics and become bigger, full of lipids and glycogen. Decidualization is a transitory phase of the endometrium, put in place to feed and protect an early implanted embryo while producing and participating in the elaboration of a complete and functional placenta. However, the intracellular and molecular mechanisms involved in the regulation of apoptosis and cell proliferation during decidualization of the endometrium are far from elucidated. It has been demonstrated previously that Akt is involved in cell survival and glycogen synthesis.

To date three isoforms of Akt have been identified and it is well recognized that they have distinct physiological roles; this could also be the case during decidualization and pregnancy. The aim of this study was to investigate the regulation of PI3K/Akt pathway during the decidualization process of endometrial stromal cells. Using decidualized HIESC cells as model, expression of Akt isoforms, Akt activity (phospho-Akt), pI $\kappa$ B, Slug and substrates of Akt during decidualization were measured. These results are the first to show a decrease in levels of Akt isoforms as well as a downregulation of Akt activities in the process of decidualization of human endometrial stromal cells. We also show that HIESC cells exhibit decreased motility during decidualization and that PI3K pathway inhibition could be involved in this process. Finally, we demonstrate that specific Akt isoforms present unique effects on decidualization induction. Further analyses will involve investigations to understand the precise signaling mechanisms by which this pathway is regulated.

## Introduction

Infertility is a problem that increasingly afflicts Canadian; in 2012, 16% of Canadian couples were found to have difficulties conceiving, a number that has doubled in the last 30 years (Bushnik, et al., 2012). The main cause of infertility can be traced to communication failure between the embryo and the maternal endometrium. This complex tissue constitutes the inner lining of the uterus and undergoes cyclic, subtle and intricate changes. During the late secretory phase of the menstrual cycle, endometrial stromal cells proliferate and differentiate by undergoing decidualization, a fundamental mechanism responsible for major changes in those cell phenotypes. Morphological transformations occur to the fibroblast-like endometrial stromal cells that differentiate into polygonal, epithelial-like cells, becoming enlarged with lipids and glycogen secretions (Brosens, et al., 1996, Tang, et al., 1994). This process of cellular differentiation is characteristic of mesenchymal to epithelial transition (MET) (Zhang, et al., 2013) and is confirmable by the decreased expression of mesenchymal markers such as Slug, Snail or Vimentin. Decidualization is a transitory phase of the endometrium that allows the decidua to feed and protect an early implanted embryo while waiting for a complete and functional placenta. It also allows the endometrium to become receptive to embryonic signaling that precedes and favorize implantation (Daly, et al., 1983).

During each reproductive cycle, the decidualization process prepares the endometrium for the incoming embryo and, possibly, implantation. Further details can be found about decidualization and implantation processes in the following review (Fabi and Asselin, 2014). Decidualization of stromal cells is induced through the concerted effect of cAMP and progesterone, or their respective analogs, 8-bromo-cyclic adenosine monophosphate (8-br-cAMP) and medroxyprogesterone acetate (MPA) (Brar, et al., 1997, Brosens, Takeda, Acevedo, Lewis, Kirby, Symes, Krausz, Purohit, Gellersen and White, 1996, Tang, et al., 1993). Progesterone is mandatory to induce as well as maintain the morphological and biochemical characteristics of the decidualization in a long term endometrial cell culture (Tang, Guller and Gurpide, 1993). On the other hand, many studies have shown that cAMP main effect is to sensitize the cells to the action of the

progesterone (Brosens, et al., 1999). The combination of those two analogs induces faster morphological and biochemical changes than progesterone alone. All those changes are associated with an increased secretion of many proteins, some of which are only secreted in response to the differentiation of the endometrium; they are thus known as marker of decidualization (Dunn, et al., 2003, Telgmann and Gellersen, 1998). Two well-known successful decidualization markers are prolactin (PRL) and insulin growth factor binding protein-1 (IGFBP1), the secretion of the former being maximal when the cells are treated with the combination of 8-br-cAMP and MPA.

It has been previously demonstrated that Akt is involved in the cell survival of the rat endometrium (Dery, et al., 2003, Veillette, et al., 2013). Akt, also known as protein kinase B (PKB), is a cytosolic serine/threonine kinase that promotes cellular survival and acts as a regulator of numerous cellular functions such as cell proliferation, growth, metabolism, angiogenesis and malignant transformation (Chin and Toker, 2009, Datta, et al., 1999). Up to date, three isoforms of Akt have been identified and possibly have distinct roles during the different phases of pregnancy (Toker and Yoeli-Lerner, 2006). The three isoforms of Akt, Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  and Akt3/PKB $\gamma$  play different roles as shown by diverse experimentations with deficient mice involving each isoform. Each isoform is produced by distinct gene but exhibit an overall amino acids homology of 80% (Datta, Brunet and Greenberg, 1999). All three phenotypes of knockout Akt1-2 or 3 mice are viable but the deletion of each Akt isoforms induces distinct metabolic and physiological changes. Mice devoid of Akt1 exhibit decreased cell survival observable by growth retardation and decreased in overall organ size and increased perinatal mortality (Chen, et al., 2001, Cho, et al., 2001); disruption of Akt2 causes reduction in insulin-stimulated glucose uptake in muscle and fat, so those mice are insulin intolerant and show diabetes-like symptoms (Cho, et al., 2001); on the other hand Akt3-deficient mice don't display these symptoms but present smaller brain size with a reduced total number of cell as well as decreased average cell size (Easton, et al., 2005). Although they possess differential as well as redundant effects, all three Akt isoforms are activated by a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in response to growth factors (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). PI3-K is a heterodimer composed of two subunits,

the catalytic subunit, p110 and an adaptor/regulatory subunit, p85. This kinase converts the phosphatidylinositol-3,4-diphosphate (PIP2) in phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), which interacts with the pleckstrin homology (PH) domain of the 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). This serine/threonine kinase is able to phosphorylate a threonine residue on Akt, who also binds to the PIP3 by its PH domain. Recruitment of Akt to the plasma membrane allows its full activation through phosphorylation of two crucial sites. A threonine residue (T308 on Akt1, T309 on Akt2 and T305 on Akt3) is phosphorylated in the catalytic domain by PDK1, and a serine residue (S473 on Akt1, S474 on Akt2 and S472 on Akt3) is phosphorylated in the C-terminus domain by the complex mTORC2 (Sarbasov, et al., 2005). Upon full activation by phosphorylation of every sites, Akt acts as a potent inducer of cell survival and proliferation which are both crucial to the fine regulation necessary for successful implantation.

The intracellular and molecular mechanisms implicated in the regulation of apoptosis and cell proliferation during decidualization of the endometrium are yet to be fully elucidated. Akt is known to regulate the cell survival but the contribution of each distinct isoform is unclear. Considering the current knowledge of these mechanisms, the purpose of this study is to determine the role of each isoform in the decidualization of the endometrium. Our results suggest that during decidualization, the protein level of each Akt isoform decreases while we also observed a decrease of phosphorylation and thus activation. Using plasmids expressing constitutively active Akt during the decidualization process, we also established that Akt1, Akt2 and Akt3 all delayed the production of decidualization markers PRL and IGFBP1. Finally, we noticed a decrease of Slug, an EMT marker, and a decrease of the phosphorylation of mTOR, a known substrate of Akt. Those results suggest that the decidualization induces MET-like molecular changes and inhibits the PI3K/Akt signaling pathway. Expression of Akt may interfere in the decidualization process and could be a novel therapeutic target in the treatment of infertility.

## Materials and Methods

### Cell culture

Human immortalized endometrial stromal cells (HIESC) were a kind gift from Michel A. Fortier (Centre de Recherche du Centre Hospitalier Université Laval (CHUL), Qc, Canada). Cells were cultured in RPMI medium (Thermo Scientific, Rockford, IL) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 50 µg/mL of gentamycin. Cells were maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Cells were maintained between 20% and 90% confluency at all times, including upon seeding.

### Reagents and antibodies

Proteasomal inhibitor (Mg132), Medroxyprogesterone 17-acetate (MPA), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor (Wortmannin) and mammalian target of Rapamycin (mTOR) inhibitor (Rapamycin) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Fetal bovine serum (FBS) and gentamycin sulfate were purchased from HyClone (South Logan, Utah). 8-Bromo-cAMP was obtained from Enzo Life Sciences Inc (Farmingdale, NY). Akt1 (2938), Akt2 (2964), AKT total (9272), phospho-AKT (4060), phospho-IκBα (2859), IκBα (9242), phospho-mTOR (2974), mTOR (2983), Slug (9585) and Ubiquitin (3933) primary antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). Anti-Akt3 (07-383) antibody was obtained from Millipore (Billerica, MA), beta-tubulin antibody from Abcam (Cambridge, MA) and monoclonal anti-β-actin-peroxidase from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were provided by Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada).

### ***In vitro* decidualization induction of HIESC**

HIESC cells were cultured in maintenance medium and then plated  $5 \times 10^5$  cells per wells. Confluent monolayers were treated in phenol red-free RPMI 1640 (Gibco® by Life Technologies™) containing 2% dextran coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS) and 50 µg/ml of gentamycin with or without 0.5 mM 8-bromo-cAMP and 1 µM MPA to induce decidualization. The culture medium was changed every two days and cells were grown at 37 °C under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, supernatants were collected and cells were harvested at days 1, 3, 6 and 9.

### **Prolactin assays**

To confirm decidualization, prolactin levels in supernatant were measured at days 1, 3, 6 and 9 of decidualization. PRL assay measurements were conducted by EIA Kit (Cayman, Ann Arbor, MI) and the optical density was read with Fluostar OPTIMA BMG spectrophotometer (BMG Labtech Inc.; Durham, NC) at 450 nm.

### **Proteasomal inhibition**

Proteasomal inhibition is used to determine if protein degradation occurs via ubiquitin-proteasome pathway. HIESC cells were seeded in six-wells plate and decidualization was induced in phenol red-free RPMI containing 2% dextran coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS) and 50 µg/mL of gentamycin with 0.5 mM 8-bromo-cAMP and 1 µM MPA. After 48 h, Mg132 was added in fresh decidualization medium and cells were incubated for another 24 h and then harvested.

### **Protein extraction and Western Blot analysis**

After each treatment HIESC cells were lysed in RIPA buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS) containing protease and phosphatase inhibitors (Complete™ and PhosSTOP from Roche Applied Science) and frozen-thawed three times, then centrifuged (13000 x g, 20 min at 4 °C) to remove



insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20 °C pending analysis. Equal amounts of protein extract (15 µg), as determined by Bio-Rad DC protein assay were loaded in each well and then resolved by SDS-PAGE. After that, proteins were transferred using a semi-dry cell onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA). Membranes were blocked with 5% milk in PBS containing 0.05% Tween 20 for 1h at room temperature, probed overnight at 4 °C with primary antibody, washed three times in PBS-0.05% Tween 20 and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad, Hercules, CA) for 45 minutes at room temperature. Hybridized membranes were washed three times in PBS-0.05% Tween 20 and protein detection was performed by detecting peroxidase activity using SuperSignal West Femto™ substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL), as described by the manufacturer's instructions. Signal was visualized using the BioImaging System (UVP, CA, USA)

### **Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)**

To measure the transcripts levels, total RNA was isolated from cells using RNeasy Mini Kit from QIAGEN (Mississauga, ON, Canada). Total RNA (1 µg) was subjected to reverse transcription using qScript cDNA Supermix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) as described by the manufacturer's instructions. The reverse-transcribed RNA was then amplified by PCR using specific primers. The expression of Akt isoforms (Akt1, Akt2 and Akt3), prolactin and IGFBP1 (Insulin-like growth factor binding protein 1) mRNAs was measured. The primer pairs used were 5'-TCTATGGCGCTGAGATTGTG-3' (forward) and 5'-CTTAATGTGCCCCGTCCTTGT-3' (reverse) for Akt1, 5'-TGAAAACCTTCTGTGGGACC-3' (forward) and 5'-TGGTCCTGGTTGTAGAAGGG-3' (reverse) for Akt2, 5'-TGAAGTGGCACACACTCTAACT-3' (forward) and 5'-CCGCTCTCTCGACAAATGGA-3' (reverse) for Akt3, 5'-AAAGGATCGCCATGGAAAG-3' (forward) and 5'-GCACAGGAGCAGGTTTGAC-3' (reverse) for prolactin and finally 5'-TTTTACCTGCCAAACTGCAACA-3' (forward) and 5'-CCCATTCCAAGGGTAGACGC-3' (reverse) for IGFBP1. Human β-



actin was used as an internal control and the primers used were 5'-CCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3' (forward) and 5'-ACGTCACACTTCATGATGGA-3' (reverse). Each reaction mixture (final volume, 25  $\mu$ L) contained OneTaq<sup>®</sup> Quick-Load<sup>®</sup> 2X Master Mix with Standard buffer (12.5  $\mu$ L) from NEW ENGLAND BioLabs, (Whitby, ON, Canada), 10  $\mu$ M forward primer (0.5  $\mu$ L), 10  $\mu$ M reverse primer (0.5  $\mu$ L), cDNA (2  $\mu$ L) and nuclease-free water (9.5  $\mu$ L). PCRs were performed in C1000 Touch<sup>™</sup> Thermal cycler, a Bio-Rad system, following these specific parameters: 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, 30 s at 68 °C for 24 cycles ( $\beta$ -actin), 32 cycles for Akt1, Akt2 and Akt3 and 33 cycles for IGFBP1 and prolactin. The PCR products obtained were separated through electrophoresis on a 1% agarose gel, stained with SYBR-Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA) and visualized with Gel Doc system (Bio-Rad).

### **Quantitative Real Time RT-PCR**

RNA was extracted using RNeasy Mini Kit from QIAGEN (Mississauga, ON, Canada). Total RNA (1  $\mu$ g) was subjected to reverse transcription using qScript cDNA Supermix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) as described by the manufacturer's instructions. All samples were subjected to real time PCR analysis with SensiFAST SYBR<sup>®</sup> Lo-ROX Kit (Bioline Reagents, MA) using an Mx3000P system (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada). For each gene target, a standard curve was generated to determine the efficiency of the reaction, and the Pfaffl analysis method was used to measure the relative quantity of gene expression. Each real time PCR was performed in duplicates from at least three independent experiments. Human prolactin was amplified using sense primer 5'-AAAGGATCGCCATGGAAAG-3' and antisense primer 5'GCACAGGAGCAGGTTTGAC-3'. For IGFBP1, expression was determined using sense primer 5'-TTTTACCTGCCAAACTGCAACA-3' and antisense primer 5'-CCCATTCOAAGGGTAGACGC-3'. Human  $\beta$ -actin was used as a reference gene based on its stable expression in all cell clones as an internal control and the primers used were 5'-CCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3' (forward) and 5'-ACGTCACACTTCATGATGGA-3' (reverse).

### **Production of HIESC cell lines with Tet-inducible constitutive active isoforms**

All three myristoylated Akt isoforms were cloned separately into pLVX-Tet3G-puro vector (Clontech) by InFusion Cloning (NEB). Briefly, first each Myr-Akt was PCR-amplified using specific primers with sequence homologous to each side of the construct. For sequence template for Myr-Akt, constitutively active (CA) Akt1 vector (pcDNA3-Myr-Akt1) was generously provided by Dr. Zhenguo Wu (Hong Kong University of Science and Technology). For Myr-Akt2 sequence template CA-Akt2 vector (pcDNA3-Myr-Akt2) was generously provided by Dr. Joseph R. Testa (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). For Myr-Akt3, we used the CA-Akt3 vector (pcDNA3-Myr-Akt3) constructed in our laboratory (PMID: 23174537) as template each PCR fragment was inserted in the pLVX-Tet3G-puro vector linearized by restriction digestion and cloned as InFusion manufacturer's instruction (Clontech). Vector were amplified in NEB Stable E.Coli and purified by MidiPrep (QIAGEN). These 3 new vectors and the pLVX-EF1a-Tet3G, were used to produce lentivirus with the Lenti-X 293T cell line and Lenti-X™ Lentiviral Expression Systems (Clontech). HIESC cells were cultured in maintenance medium and then plated  $3 \times 10^5$  cells per wells. Media was removed and replaced by media containing a combination of EF1a-Tet3G lentivirus and either Myr-Akt1, Myr-Akt2 or Myr-Akt3 lentivirus in the presence of 5.4 ug/mL retronectin, and incubated for 24 hrs at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Then, media was refreshed and 24 hrs of recovery later, a pool of transduced cells were selected in the presence of 100 ug/mL G418 and 0.05 ug/mL puromycin. Doxycycline-induction of Myr-Akt1, 2 and 3 isoforms in these cells in culture was confirmed by western blots using Akt1, 2 or 3 antibody and p-Akt(Ser473) antibody, as previously demonstrated (PMID: 23174537).

### ***In vitro* decidualization of Tet-inducible HIESC cell lines**

HIESC-Myr-Akt1, HIESC-Myr-Akt2 or HIESC-Myr-Akt3 cells were cultured in maintenance medium and then plated  $5 \times 10^5$  cells per wells. Confluent monolayers were treated in phenol red-free RPMI 1640 (gibco® by life technologies™) containing 2% dextran coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS) and 50 µg/mL of gentamycin with or without 0.5 mM 8-bromo-cAMP and 1 µM MPA to induce decidualization. For Tet3G

induction of Myr-Akt isoforms, 1  $\mu\text{g/mL}$  doxycycline was added to the culture media in appropriate wells. The culture medium was changed every two days and cells were grown at 37 °C under a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ , RNA from cells was harvested at days 3 and used for qPCR analysis of decidualization markers.

### **Wound healing assay**

Cells were seeded into six-well plates and allowed to grow in maintenance medium until they reached 90% confluence. Cells monolayers were scratched with the blunt end of a standard p10 pipette tip and dislodged cells were washed away with PBS. Cells were then incubated in phenol red-free RPMI containing 2% dextran coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS), 50  $\mu\text{g/mL}$  of gentamycin and one of the following: for decidualization induction: 0.5 mM 8-bromo-cAMP and 1  $\mu\text{M}$  MPA, for PI3K inhibition: 1  $\mu\text{M}$  Wortmannin, for mTOR inhibition: 100 nM Rapamycin. Migration was captured using an Olympus microscope at 0, 6, 12, and 24 h post-wounding. Wound closure was quantified as the percentage of recovered area using Image J software.

### **Statistical analysis**

All the experiments were repeated three times. Densitometric analyses were performed using Quantity One software (Bio-Rad). Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 5.0; GraphPad, San Diego, CA) followed by Tukey's test to determine the differences between the experimental groups. Differences were considered significant at the level of  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **Decidualization of HIESC**

MPA and cAMP are known inducers of decidualization in endometrial stromal cells, a process upon which the stromal cell adopt an epithelioid phenotype. To confirm that the

decidualization process occurred using cAMP and MPA treatment in HIESC cells, we analyzed cell morphology and measured the production of known well-characterized decidual markers, IGFBP1 and PRL. Upon concomitant treatment of cAMP and MPA, we observed a clear morphological changes characteristic of decidual cells (Fig. 1A). Cells became enlarged, somewhat polygonal, and full of lipids and glycogen. The usually spindle-shaped stromal cells differentiated into ovoid cells displaying abundant cytoplasm; the sum of these changes can be described as a transition from mesenchymal to epithelial shape. We also measured mRNA expression of the decidual gene markers IGFBP1 and PRL. Densitometric analyses of qRT-PCR analysis revealed a significant increased expression of both IGFBP1 (Fig.1B) and PRL (Fig. 1C) mRNA following cAMP+MPA treatments. Finally, the decidualization treatment significantly stimulated the secretion of PRL, a decidual marker, to its maximum on day 6 ( $12,69 \pm 2.07$  ng/mL) then PRL decreased to reach  $5,55 \pm 2,04$  ng/mL on day 9 (Fig. 1D). Taken together, these results strongly suggest that the combined use of cAMP and MPA is effective in inducing decidualization in HIESC cells.

### **Expression of Akt isoforms during *in vitro* decidualization**

We previously demonstrated that the PI3K/Akt pathway is crucial in the rat endometrium for cell survival (Dery, Leblanc, Shooner and Asselin, 2003, Veillette, Grenier, Brasseur, Frechette-Frigon, Leblanc, Parent and Asselin, 2013); we thus sought to determine the expression and activity of Akt during MPA+cAMP induced decidualization. We found that protein level of each Akt isoform was decreased with the induction of decidualization, although with various levels of significance depending on the length of the treatment (Fig. 2A). Additionally, we observed a decrease in total Akt and a sharp, significant decrease in phosphorylated Akt on serine 473 (pAkt (ser473)) (Fig. 2A). Interestingly, RT-PCR analysis demonstrates that mRNA expression of those isoforms was not decreased (Figure 2B). Taken together, the reduced Akt levels but unchanged transcripts levels strongly suggest that decidualization is accompanied by a degradation of Akt. To assess the mechanism responsible for this degradation we used Mg132, a proteasome inhibitor. Inhibition of the proteasome did not allow the recovery

of total Akt protein levels nor Akt phosphorylation following cAMP+MPA treatments (Fig. 3B). Further experiments also revealed that no changes could be observed in an isoform-specific manners and that Mg132 again failed to oppose the decidualization-induced loss of Akt isoforms (Fig. 3C). Taken together, these results confirm that cAMP+MPA induced decidualization reduced Akt1 and Akt2 isoforms level and activity and that this degradation and loss of phosphorylation is not mediated by the proteasomal degradation pathway.

### ***In vitro* modulation of PI3K/Akt activity and other pathways upon induction of decidualization**

Results obtained from the previous experiments suggested that decidualization diminished Akt phosphorylation, and thus, activity. To ascertain this hypothesis, the PI3K/Akt pathway activity was evaluated by measuring the expression and activation by phosphorylation of Akt, the main regulator of this pathway but also by measuring the phosphorylation of natural substrates of Akt; considering that Akt is known to directly activates mTOR (Sekulić, et al., 2000, we measured the phosphorylation level of mTOR as an indicator of Akt activity. Upon cAMP+MPA treatments, we observed decreased phosphorylation levels of mTOR while the total level of mTOR remained unchanged (Fig.4A); while the result attained statistical significance only on day 9, a clear trend can be observed. This suggests that Akt activity is reduced and that decidualization induction contributes to the downregulation of the mTOR pathway. We then further investigated the regulation of signaling cascades that might be regulated by the modulation of PI3K/Akt pathway observed during decidualization. Akt regulates the activity of the NF- $\kappa$ B through the activation of IKK, which phosphorylates I $\kappa$ B, allowing nuclear entry of NF- $\kappa$ B (Figure 4B).

We observed an increase in the phosphorylation of I $\kappa$ B (Fig.4B). This result suggests that a PI3K/Akt-independent activation of the NF- $\kappa$ B occurs in decidualization. Finally, some of the changes observed in the phenotype of stromal cell are reminiscent of mesenchymal to epithelial transition (MET). In order to evaluate whether classical EMT markers were involved in this change, we assessed the change in Slug, a transcription

factor known to regulate epithelial to mesenchymal transition (EMT); Slug was found to be significantly decreased upon decidualization (Fig. 4C), which strongly suggest that HIESC cells undergo some form of MET during decidualization.

### **Effect of PI3K/Akt pathway inhibition on cell motility**

The ability of the PI3K/Akt pathway to influence cell migration is documented (Chin and Toker, 2009); the importance of cell motility during the embryo implantation is also recognized (Haslinger, et al., 2013). To evaluate the modulation of cell motility in our model, we performed a wound healing assay on decidual endometrial stromal cells. We noticed that the cAMP and MPA treatment significantly reduced cell motility, as shown by the failure of cAMP+MPA treated cell to close the created wound (Fig. 5). We then sought to understand whether Akt loss, observed in the preceding experiments upon cAMP+MPA induced decidualization, was responsible for this change in cell motility. We treated the HIESC with Wortmannin, a PI3K inhibitor, and rapamycin, an mTOR inhibitor. We observed that the inhibition of the PI3K pathway by Wortmannin significantly reduced cell motility in a way very similar to the effect of cAMP+MPA induced decidualization (Fig. 6). However, rapamycin failed to reduce cell motility in endometrial stromal cells. Taken together, these results suggest that the decreased cell motility observed during decidualization seems to be associated with PI3K/Akt, independently of the mTOR pathway activity.

### **Effect of constitutive active Akt isoforms on the decidualization process**

To investigate the effect of specific Akt isoforms on the decidualization process, we produced Tet-On vectors capable of expressing, upon doxycycline treatment, a constitutively active form of each Akt isoforms. The constitutive activation of Akt was achieved through the use of a myristoylation signal allowing forced localization of Akt to the membrane and facilitating its phosphorylation by its effectors. The experiment was conducted either treating the cells concomitantly with doxycycline, to induce Akt expression and cAMP+MPA, to induce decidualization or the cells were decidualized



and doxycycline was applied 24 h later. We decided to use these two treatment regimen in order to differentiate the effect on Akt on initialization and sustainment of decidualization.

In both cases, the cells were lysed on day three and qRT-PCR was performed to quantify PRL (prolactin) mRNA expression, as a marker of successful decidualization; our experiments show that Akt1 and Akt2 significantly decrease the expression of PRL while Akt3 displays no such effect (Fig. 7A). Also, the obtained results clearly show that the timing of Akt expression does not influence the change in PRL expression. Taken together, our results suggest that Akt1 and Akt2 oppose decidualization while Akt3 is uninvolved in this process.

## Discussion

Decidualization is an important event in the uterus to allow implantation. When endometrial stromal cells undergo decidualization, they differentiate and many signaling pathways are affected. Firstly, the secretion of deciduals markers is induced and morphological changes are observed. Secondly, cAMP and MPA co-treatment on endometrial stromal cells is associated with cell cycle arrest at G0/G1 phase initially and G2/M phase at later stages to permit differentiation of the treated cells (Logan, et al., 2012). This cell cycle arrest during decidualization can affect many pathways, in particular survival pathways. PI3K/Akt is a well-known survival pathway. Moreover, activation of this pathway can easily be measured directly by the phosphorylation of Akt and its substrates. The aim of the present study was to characterize the expression of the PI3K/Akt survival pathway in the human endometrial stromal cells during decidualization *in vitro*.

Our study establishes that PI3K/Akt pathway was significantly decreased with the induction of decidualization, as well as its substrates and downstream pathways affected. We demonstrated that this decrease in Akt isoforms protein levels did not involve ubiquitin-proteasome degradation. Another degradation system is implicated during decidualization; more studies are needed to find out which one is responsible for this



Akt protein degradation. The decreased activity of PI3K/Akt pathway during decidualization affects downstream pathways such as EMT. EMT is an important pathway during development and oncogenesis and is regulated by Akt pathway. During this cell transformation, epithelial cells acquire fibroblast-like properties and show reduced intracellular adhesion and increased motility. In a recent study, constitutively active Akt were expressed in squamous cell carcinoma lines and they underwent EMT (Grille, et al., 2003). The induction of EMT was characterized by down-regulation of epithelial markers desmoplakin, E-cadherin, and  $\beta$ -catenin, and up-regulation of the mesenchymal marker vimentin. Those constitutively active Akt cells also exhibited reduced cell-cell adhesion, increased motility on fibronectin-coated surfaces, and increased invasiveness in animals (Grille, et al., 2003). A decrease in PI3K/Akt pathway will conduct to the reverse phenotype of this phenomenon called mesenchymal to epithelial transition (MET). When the cells undergoes MET, they let go of their fibroblast-like properties, that are characteristic of mesenchymal cells, to acquire more epithelial cells-like characteristics. The morphological changes that we observed with the induction of decidualization concord with this phenotype. MET can be measured by looking at the expression level of Snail and Slug known to decrease with MET and by switch of cadherin, the up-regulation of E-cadherin and down-regulation of N-cadherin. A recent study also shows those changes during *in vitro* decidualization (Zhang, Liang, Liang, Wang, Qi, Deng, Sha and Yang, 2013). In our study, we observed a decrease in Slug protein level that confirms the induction of MET process.

Akt protein is responsible of migration regulation by controlling actin organization, cell-to-cell adhesion, cell motility and extracellular degradation. In particular, Akt1 is known to increase fibroblasts motility by phosphorylating Girdin, an actin-binding protein essential for the integrity of the actin cytoskeleton and cell migration (Enomoto, et al., 2005). Phosphorylation of Girdin by Akt controls its association with plasma membrane and facilitates the lamellipodium formation. Akt1 also enhances matrix metalloproteinase-2 (MMP2) activity in mouse mammary epithelial cells and invasion (Park, et al., 2001). This proteinase is responsible for extracellular matrix modification and known to degrade the matrix components. Moreover, the influence of Akt isoform 1

and 3 are known to influence cell motility since a shRNA of those isoforms resulted in a decrease cell migration in trophoblast cells (Haslinger, Haider, Sonderegger, Otten, Pollheimer, Whitley and Knöfler, 2013). In them study, Akt2 isoform did not show increased or decreased in cell motility. Cells motility seems to be an important event in the successfulness of the implantation because trophoblastic cells are known as invasive cells. This invasiveness is important for a profound implantation in the decidual tissue. The endometrial stromal cells can also affect this implantation process but it is not known how the cell motility is involved during decidualization. Stromal cells are suspected to encapsulate the conceptus in presence of trophoblastic cells. In our models, no influence of trophoblast cells or signals are present and we observed both a decrease in cell motility and decreased of Akt isoforms. We also demonstrated that the decrease is directly associated with Akt protein levels and not with decrease of their substrate such as mTOR.

Activation of PI3K/Akt is known to affect the synthesis of decidual markers. During endometriosis where increase activity of this pathway is present, a decrease in the decidual marker (IGFBP1 and PRL) was observed (Yin, et al., 2012). An inhibition of Akt activity using LY294002, a PI3K inhibitor, resulted in an increase of IGFBP1 mRNA. Additionally, a majority of endometrial cancers present a mutation in PTEN or a decrease of its expression, causing an increased PI3K/Akt activity (Kong, et al., 1997, Risinger, et al., 1998). In our study, decidualization induced a decrease of each Akt isoforms. Reinsertion of those isoforms during decidualization may interfere with differentiation. Our results show that forced induction of Akt1 and Akt2 decreased expression of the decidual marker PRL. Reinsertion of Akt2 was the isoform with the most important impact on the level of PRL expression. Thus, decrease of the PI3K/Akt pathway activity seems to be an important step in the process of decidualization in the endometrial stromal cells.

The present study demonstrates that the PI3K/Akt has many effects during the decidualization process and that its forced expression may interfere within this process. We know that a deregulated activity of this pathway is being responsible of number of

different pathologies such as some have a phase of tissues differentiation and this process can be deregulated by an inappropriate regulation of the PI3K/Akt pathway. For example, human embryo implantation needs a differentiation of the endometrium to be receptive. Thus, deregulation of PI3K/Akt pathway can results in a non-receptive endometrium and cause infertility. A deeper understanding of this pathway in the decidualization process could allow the development of novel therapies against infertility.

#### **Author's roles**

KG, FF, VL, SP performed the experiments. KG, FF, SP, EA wrote the manuscript. EA conceived the studies.

#### **Acknowledgment**

Kathy Grenier was holder of master scholarship from Réseau Québécois en Reproduction (RQR). We are grateful to Michel A. Fortier for the HIESC cells.

#### **Funding**

This work was supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (238501-01).

#### **Conflict of interest**

None to declare

## References

- Brar A, Frank G, Kessler C, Cedars M, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocr* 1997; 6: 301-307.
- Brosens JJ, Hayashi N, White JO. Progesterone Receptor Regulates Decidual Prolactin Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4809-4820.
- Brosens JJ, Takeda S, Acevedo CH, Lewis MP, Kirby PL, Symes EK, Krausz T, Purohit A, Gellersen B, White JO. Human endometrial fibroblasts immortalized by simian virus 40 large T antigen differentiate in response to a decidualization stimulus. *Endocrinology* 1996; 137: 2225-2231.
- Bushnik T, Cook JL, Yuzpe AA, Tough S, Collins J. Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Hum Reprod* 2012; 27: 738-746.
- Chen WS, Xu P-Z, Gottlob K, Chen M-L, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K *et al*. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes & Development* 2001; 15: 2203-2208.
- Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cellular Signalling* 2009; 21: 470-476.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science (New York, NY)* 2001; 292: 1728-1731.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKB $\alpha$  Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 38349-38352.
- Daly DC, Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium. *American journal of obstetrics and gynecology* 1983; 145: 672-678.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development* 1999; 13: 2905-2927.

- Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 47.
- Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 151-161.
- Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM-Y, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T *et al.* Role for Akt3/Protein Kinase B $\gamma$  in Attainment of Normal Brain Size. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25: 1869-1878.
- Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Developmental cell* 2005; 9: 389-402.
- Fabi F, Asselin E. Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. *Reproduction* 2014; 148: R85-95.
- Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschlis PN, Larue L. The Protein Kinase Akt Induces Epithelial Mesenchymal Transition and Promotes Enhanced Motility and Invasiveness of Squamous Cell Carcinoma Lines. *Cancer Research* 2003; 63: 2172-2178.
- Haslinger P, Haider S, Sonderegger S, Otten JV, Pollheimer J, Whitley G, Knöfler M. AKT Isoforms 1 and 3 Regulate Basal and Epidermal Growth Factor-Stimulated SGHPL-5 Trophoblast Cell Migration in Humans. *Biology of reproduction* 2013; 88: 54, 51-11.
- Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S, Yokoyama T, Yamakawa H, Furukawa T, Sato M *et al.* PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* 1997; 17: 143-144.
- Logan PC, Steiner M, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Cell Cycle Regulation of Human Endometrial Stromal Cells During Decidualization. *Reproductive Sciences* 2012; 19: 883-894.
- Park BK, Zeng X, Glazer RI. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001; 61: 7647-7653.
- Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, Berchuck A. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clinical Cancer Research* 1998; 4: 3005-3010.

- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* 2005; 307: 1098-1101.
- Sekulić A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, Abraham RT. A Direct Linkage between the Phosphoinositide 3-Kinase-AKT Signaling Pathway and the Mammalian Target of Rapamycin in Mitogen-stimulated and Transformed Cells. *Cancer Research* 2000; 60: 3504-3513.
- Tang B, Guller S, Gurpide E. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology* 1993; 133: 2197-2203.
- Tang B, Guller S, Gurpide E. Mechanism of Human Endometrial Stromal Cells Decidualization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994; 734: 19-25.
- Telgmann R, Gellersen B. Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Human Reproduction Update* 1998; 4: 472-479.
- Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt Signaling and Cancer: Surviving but not Moving On. *Cancer Research* 2006; 66: 3963-3966.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; 346 Pt 3: 561-576.
- Veillette A, Grenier K, Brasseur K, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Parent S, Asselin E. Regulation of the PI3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium. *Biology of reproduction* 2013; 88: 79.
- Yin X, Pavone ME, Lu Z, Wei J, Kim JJ. Increased Activation of the PI3K/AKT Pathway Compromises Decidualization of Stromal Cells from Endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012; 97: E35-E43.
- Zhang X-H, Liang X, Liang X-H, Wang T-S, Qi Q-R, Deng W-B, Sha A-G, Yang Z-M. The Mesenchymal-Epithelial Transition During In Vitro Decidualization. *Reproductive Sciences* 2013; 20: 354-360.

## Figures

Figure 1

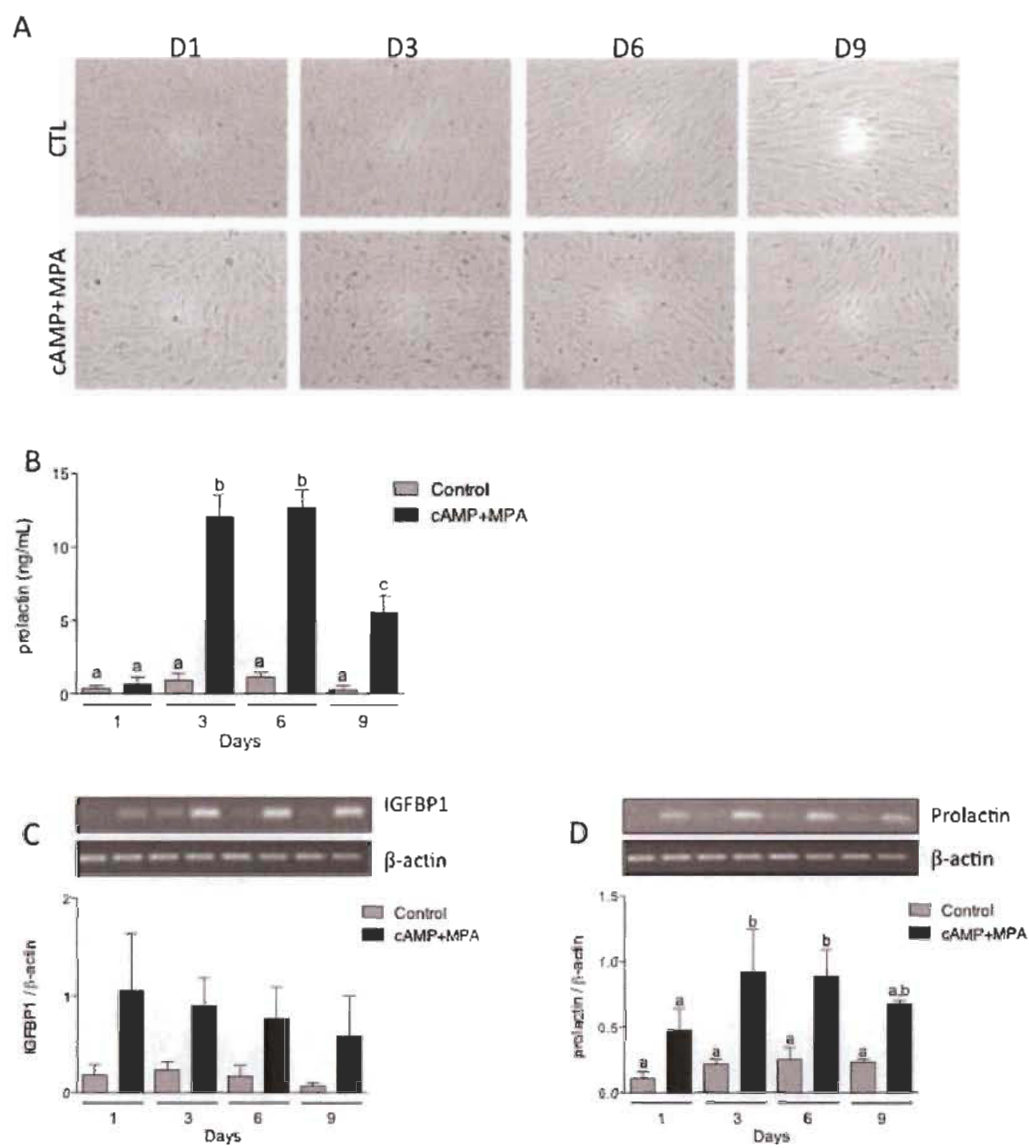




Figure 2

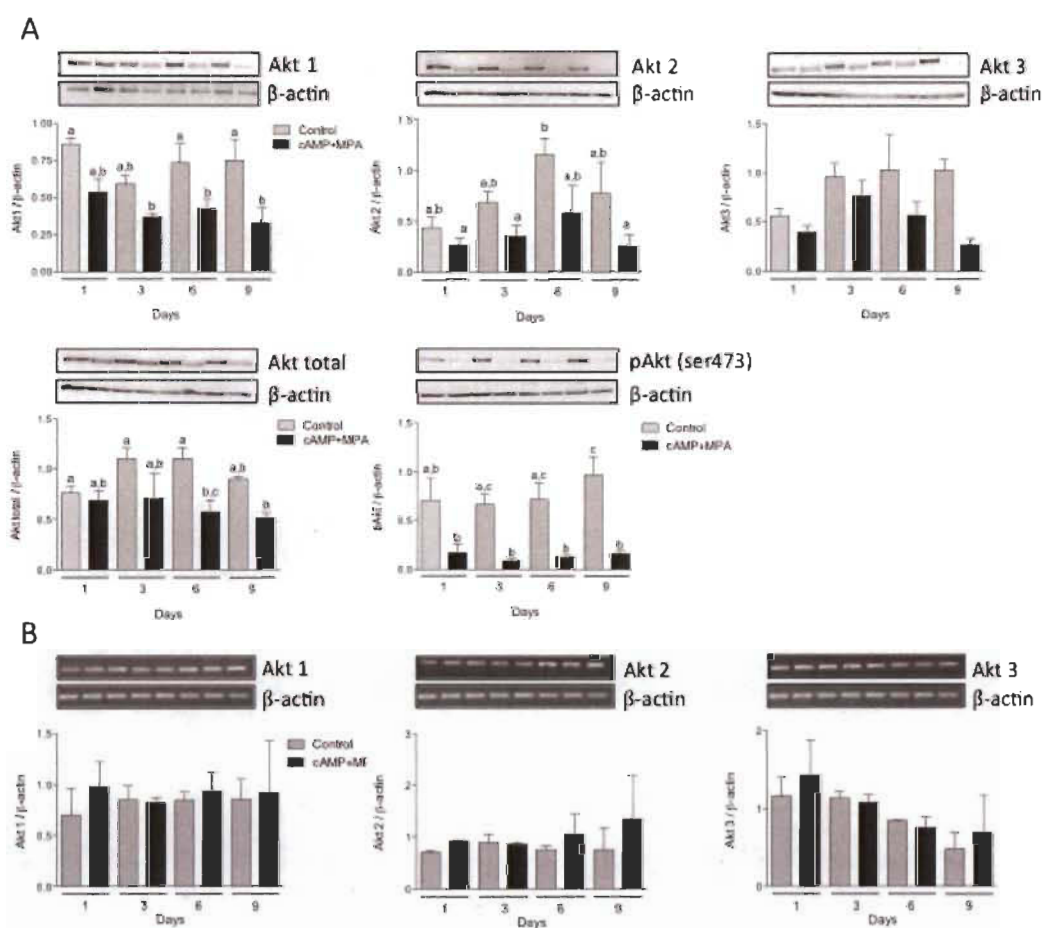


Figure 3

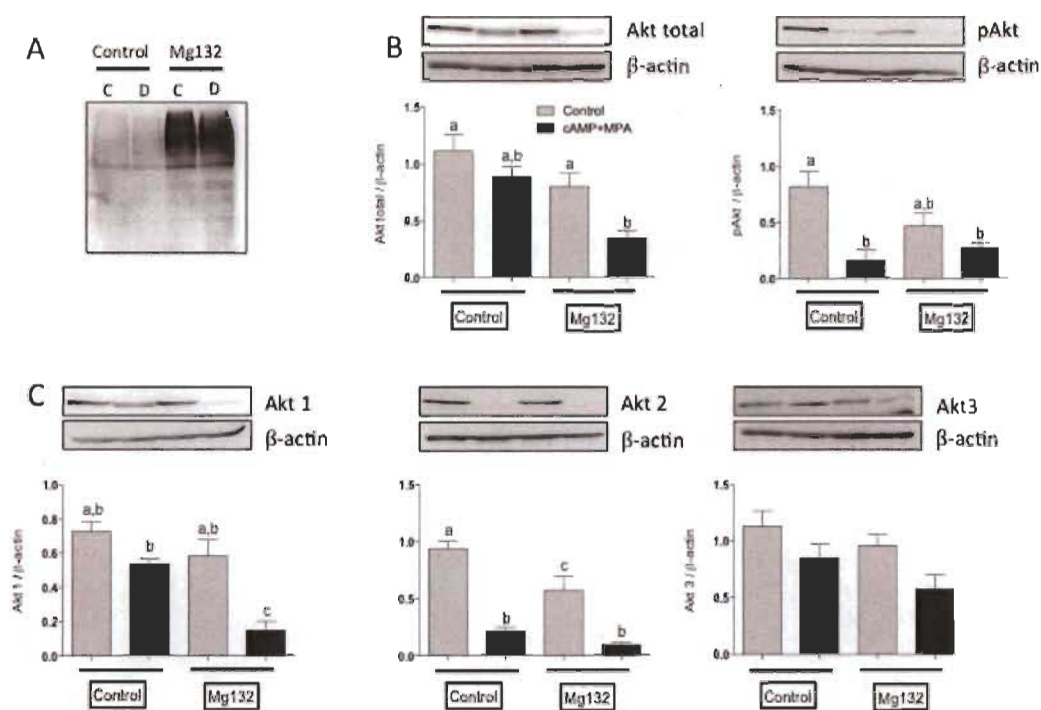


Figure 4

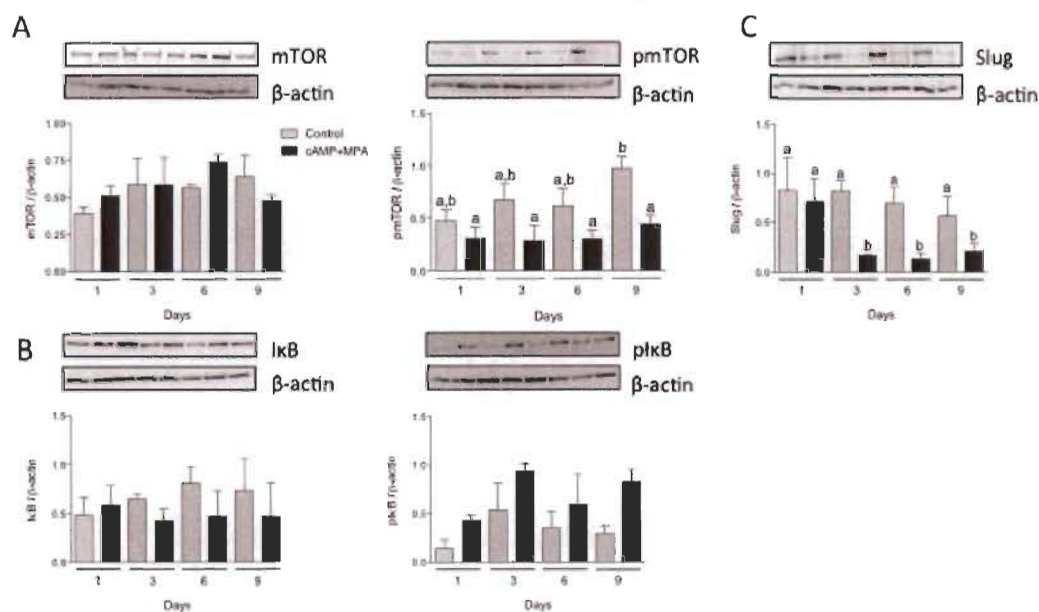


Figure 5

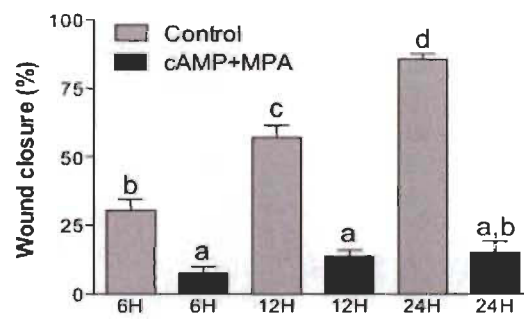
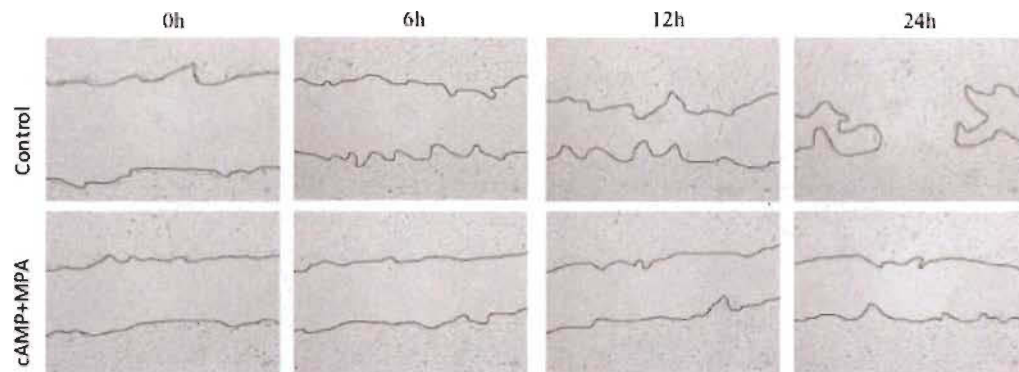


Figure 6

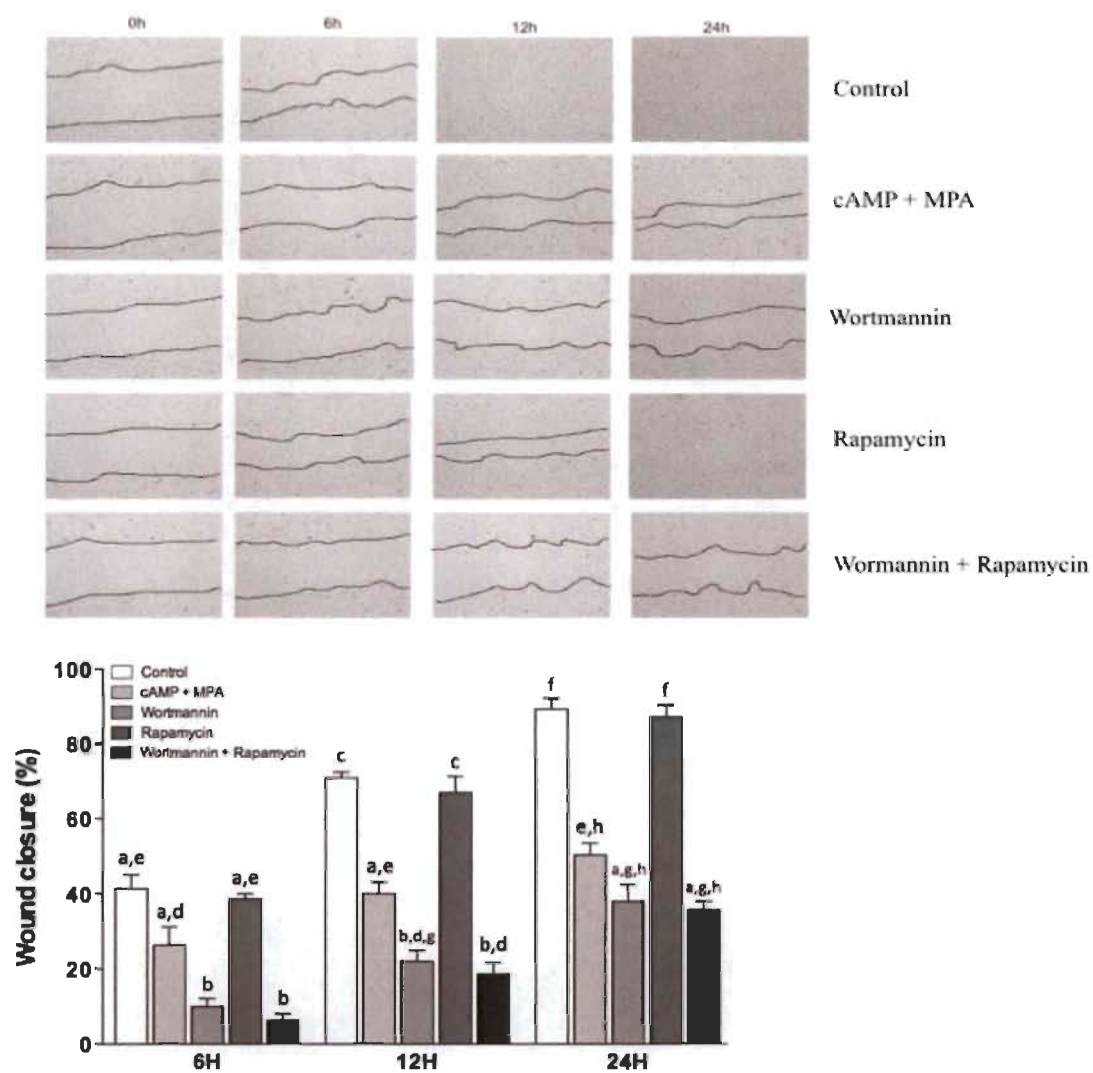
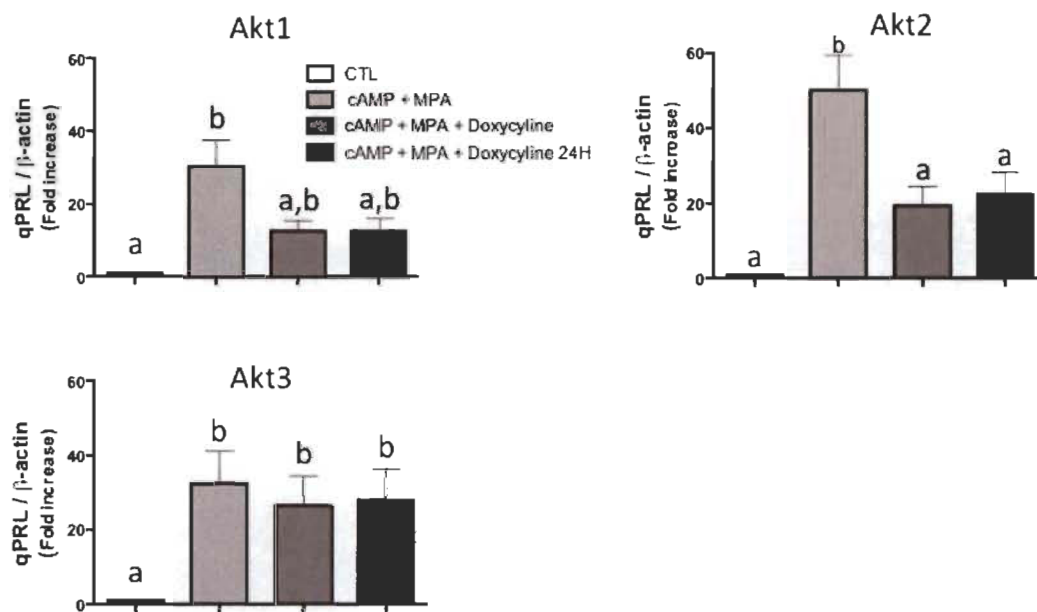


Figure 7



## Figures legends

**Figure 1:** Induction of decidualization. **(A)** Treatment with cAMP (0.5 mM) and MPA ( $10^{-6}$ M) for 9 days induced a morphological change in HIESC from a spindle to an ovoid shape. Images were taken using an Olympus BX60 microscope at 40x magnification. **(B)** Induction of PRL secretion by the same treatment in HIESC at different days (1, 3, 6 and 9) of culture. A significant increase was found at days 6 and 10 with maximal levels observed at day 6 ( $P < 0.0001$ ). The data represent the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments run in duplicate. Expression of decidual marker genes, IGFBP1 **(C)** and PRL **(D)**, mRNA were analysed by qRT-PCR. The data represents the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments.  $\beta$ -actin blots was used as loading controls. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometric analysis. Data are means  $\pm$  SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2:** Expression of Akt isoform, total Akt and pAkt during induction of decidualization. Cells were incubated in the presence or absence of cAMP (0.5 mM) and MPA ( $10^{-6}$ M) for a total of nine days. Total protein and RNA were then extracted. **(A)** Western blot was performed to quantify the change in specific Akt isoforms levels as well as total Akt levels. pAkt (ser473) was used to assess Akt activation **(B)** RT-PCR was performed for each Akt isoforms to evaluate change in mRNA transcription. Data represent means  $\pm$  SEM for three independent experiments.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent densitometric analysis. Data are means  $\pm$  SEM three independent experiments. Different letters indicate significantly different means ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3:** *In vitro* modulation of PI3K/Akt pathway with the induction of decidualization. Induction of decidualization was induced with cAMP (0.5 mM) and MPA ( $10^{-6}$  M) for 48 h, then MG132 was added and incubated for another 24 h. **(A)** Treatment using Mg132 increased total ubiquitination, both in control conditions and decidualized cells, indicating that the Mg132 was effective at inhibiting proteasomal degradation. **(B)** Total Akt and pAkt levels were measured by Western blot.

(C) Individual Akt isoforms levels were assessed by Western blot.  $\beta$ -actin was used as loading control. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometric analysis. Data are means  $\pm$  SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4:** *In vitro* modulation of PI3K/Akt pathway and their effects with the induction of decidualization. Cells were incubated in the presence or absence of cAMP (0.5 mM) and MPA ( $10^{-6}$ M) for a total of nine days. mTOR and pmTOR protein expression (A), I $\kappa$ B and pI $\kappa$ B protein expression (B) and Slug protein expression (C) were measured during decidualization. Total proteins were collected on different days of decidualization.  $\beta$ -actin was used as loading control. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometric analysis. Data are means  $\pm$  SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ( $p < 0.05$ ).

**Figure 5:** Decidualization induces reduced cell motility. (A) Wound healing assays were performed using HIESC treated with either vehicle or cAMP (0.5 mM) and MPA ( $10^{-6}$ M). HIESC were allowed to grow until they reached confluence; cells monolayers were then scratched with the blunt end of a tip and images were captured at 0, 6, 12 and 24 h postwounding in order to assess cell motility. Wound closure was quantified as the percentage of recovered area. Data are means  $\pm$  SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ( $p < 0.05$ ). Images were taken using an Olympus BX60 microscope at 40x magnification.

**Figure 6:** Inhibition of PI3K/Akt pathway induces a cell motility arrest. Wound healing assays were performed using HIESC treated with either vehicle or cAMP (0.5 mM) and MPA ( $10^{-6}$ M). HIESC were allowed to grow until they reached confluence; cells monolayers were then scratched with the blunt end of a tip and images were captured at 0, 6, 12 and 24 h postwounding in order to assess cell motility. Treatment consisted of either vehicle (control), cAMP (0.5 mM) and MPA ( $10^{-6}$ M),  $10^{-6}$ M Wortmannin (PI3K inhibitor) or 100 nM Rapamycin (mTOR pathway inhibitor) or combinations of these



compounds. Wound closure was quantified as the percentage of recovered area. Data are means  $\pm$  SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ( $p < 0.05$ ). Images were taken using an Olympus BX60 microscope at 40x magnification.

**Figure 7:** Effect of forced expression of Akt isoforms (CA-Akt) on PRL expression. mRNA expression of each Akt isoform following three day treatments. HIESC cells were subjected to decidualization using cAMP (0.5 mM) and MPA ( $10^{-6}$ M). They were then either concomitantly treated with doxycycline (1 $\mu$ g/mL) in order to induce the expression of the constitutive Akt isoform construct (cAMP+MPA+Doxycycline) or cells were allowed to decidualize for 24 h before doxycycline was added (cAMP+MPA+Doxycycline 24H). Cells were lysed after three days and qRT-PCR analyses were performed to quantify each Akt isoforms mRNA expression.  $\beta$ -actin mRNA expression was used as control for qPCR results. Data are means  $\pm$  SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ( $p < 0.05$ ).

## CHAPITRE III

### DISCUSSION ET CONCLUSION

#### 3.1 Discussion

L'infertilité féminine touche de plus en plus de femmes en âge de procréer. Plusieurs raisons amènent ce déclin de la fertilité. En effet, les femmes de nos jours sont portées à d'abord s'instruire et se construire une carrière avant de bâtir leur famille. De plus, il arrive que certains désordres dans des processus cellulaires et moléculaires soient responsables de l'infertilité féminine.

Il existe diverses approches pour aider la femme à porter un enfant malgré leur baisse de fertilité, comme la stimulation hormonale et la fécondation *in vitro*. Par contre, ces mécanismes contournent l'origine du problème.

Le laboratoire du Dr Éric Asselin possède une expertise sur une protéine impliquée dans plusieurs processus biologiques, la protéine Akt. Cette dernière a été étudiée à plusieurs reprises dans des études pourtant sur la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose, la mort cellulaire, de même que pour ses rôles dans l'invasion et la progression du cycle cellulaire. Certaines études ont permis de montrer que Akt était impliqué dans le phénomène d'endométriose. L'endométriose se définit comme la présence de muqueuse utérine en dehors dans la cavité utérine. Nous savons que le tissu endométrial est hormono-sensible, que la protéine Akt y est impliquée et que l'endométriose cause des douleurs et de l'infertilité. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à Akt et son impact sur les cellules endométriales lors du cycle menstruel.

Ainsi, la présente étude tente de déterminer le rôle de cette protéine dans la décidualisation des cellules stromales endométriales humaines. Le processus de

décidualisation est essentiel pour la préparation de l'endomètre à recevoir un embryon et peut assurément affecter la fertilité féminine. Nous avons utilisé des cellules HIESC, des cellules stromales endométriales humaines immortalisées et nous avons induit le processus de décidualisation avec de l'AMPc et du MPA. Par la suite, nous avons confirmé que la décidualisation était bien induite en mesurant des marqueurs de décidualisation bien connus que sont l'IGFBP1 et la prolactine dans le surnageant des cellules induites, ainsi que leur expression génique. Une fois l'induction de la décidualisation confirmée nous avons mesuré les niveaux protéiques d'Akt et de ses trois isoformes (Akt1, Akt2 et Akt3). L'expression protéique des différentes isoformes est diminuée par l'induction de la décidualisation, ainsi que l'activation par phosphorylation de ces dernières. Cela montre que la voie de signalisation Akt est réprimée lors de la décidualisation des cellules endométriales. Nous savons que lors de la décidualisation survient un processus de différenciation cellulaire, c'est-à-dire que la morphologie de la cellule se modifie et que les cellules acquièrent de nouvelles caractéristiques. La différenciation des cellules endométriales lors de la décidualisation pourrait expliquer pourquoi la voie de signalisation Akt est réprimée. Les cellules ne sont plus en phase de croissance, mais bien en phase de différenciation

Après avoir observé la diminution protéique des isoformes d'Akt, nous avons mesuré l'expression génique des différentes isoformes pour savoir si la diminution protéique résultait d'une diminution de l'expression du gène de la protéine ou bien une dégradation de la protéine. Les résultats obtenus montrent que la diminution de la protéine vient probablement d'une dégradation de la protéine étant donné que les niveaux d'expression génique ne varient pas entre les cellules contrôles et les cellules où la décidualisation est induite. Restait à savoir si cette dégradation protéique était due à une dégradation par le protéasome. Nous avons bloqué le protéasome à l'aide d'un inhibiteur du protéasome, le MG132. Suite à cette expérience, nous avons constaté que la diminution des niveaux protéiques des isoformes d'Akt ne résultait pas d'une dégradation par le protéasome puisque l'inhibition de ce dernier ne restaurait pas les niveaux d'isoformes d'Akt.

Pour comprendre davantage l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt, nous avons regardé certains substrats connus d'Akt, comme le mTOR pour savoir si ces derniers étaient aussi réprimés lors de l'induction de la décidualisation [46]. Nous avons ainsi remarqué que la phosphorylation de mTOR normalement induite par Akt était également réprimée par l'induction de la décidualisation. Ces résultats montrent que l'inhibition des isoformes d'Akt lors de la décidualisation peut avoir de multiples conséquences étant donné la grande quantité de substrats d'Akt.

Nous savons que Akt est également impliqué dans la migration des cellules dans certains cancers, par un processus appelé la migration cellulaire et l'invasion. Nous avons donc vérifié si la mobilité des cellules endométriales était affectée lors de la décidualisation. Ainsi, nous avons procédé à des tests de mobilité des cellules en laissant les cellules poussées sur une plaque de pétri, puis une fois le tapis cellulaire formé, nous avons créé une brèche dans ce tapis cellulaire et induit ou non la décidualisation et mesuré le temps nécessaire pour refermer la brèche. Suite à cette expérience, nous avons conclu que l'induction de la décidualisation induit un ralentissement de la mobilité des cellules endométriales étant donné que les cellules décidualisées prennent beaucoup plus de temps à refermer la brèche que les cellules où la décidualisation n'a pas été induite. De plus, pour confirmer que la diminution de la mobilité des cellules était effectivement due à l'inhibition des isoformes d'Akt, nous avons refait l'expérience de la brèche du tapis cellulaire, mais au lieu d'induire la décidualisation nous avons traité les cellules avec un inhibiteur de la PI3K, le Wortmannin ou avec la rapamycine, un inhibiteur du substrat d'Akt, mTOR ou un traitement combiné de ces deux inhibiteurs. Ainsi, nous observons que le ralentissement des cellules vient de l'inhibition d'Akt étant donné que les résultats avec le traitement au Wortmannin seul indiquent un ralentissement important de la mobilité des cellules, tandis que le traitement avec la rapamycine seule ne ralentissait pas la fermeture de la brèche.

Finalement, pour vérifier si l'expression d'Akt doit effectivement être inhibée lors de l'induction de la décidualisation, nous avons modifié nos cellules HIESC en insérant un vecteur inductible à la doxycycline contenant les trois différentes isoformes d'Akt

dans des vecteurs différents. Ainsi, nous pouvons comparer l'effet des trois isoformes de façon séparée sur l'expression des marqueurs de décidualisation. Dans cette expérience, nous avons mesuré le taux d'expression génique de la prolactine suite à l'induction de chacune des isoformes d'Akt. Ainsi, nous observons que l'induction d'Akt peut interférer avec le processus de décidualisation étant donné l'expression forcée de l'isoforme Akt2 diminue de façon significative l'expression de la prolactine. L'isoforme Akt1 diminue également l'expression génique de la prolactine, mais moins intensément que l'isoforme Akt2 et finalement l'isoforme Akt3 ne semble pas diminuer l'expression de la prolactine.

### 3.2 Perspectives de recherche

D'autres études sont nécessaires pour comprendre plus précisément comment les différentes isoformes d'Akt peuvent nuire à la décidualisation des cellules endométriales et si une mauvaise régulation de la voie de signalisation d'Akt pourrait être la cause de certains cas d'infertilité féminine. En effet, une surexpression anormale d'Akt lors du processus de décidualisation pourrait nuire à la bonne induction de la décidualisation et ainsi occasionner une mauvaise préparation de l'endomètre à recevoir un embryon.

De plus, pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*, l'étude de la voie de signalisation d'Akt chez la souris pourrait être envisagée. Une étude précédente au laboratoire a montré que l'utilisation de Wortmannin n'affectait pas le nombre de sites d'implantation, ce qui montre que l'inhibition d'Akt serait aidante pour l'implantation [71]. Mais il serait intéressant de procéder à une induction des isoformes d'Akt chez la souris lors de la décidualisation pour observer si le nombre de sites d'implantation serait diminué par une induction des isoformes d'Akt. De même que de voir si chacune des isoformes d'Akt affecte de façon équivalente le nombre de sites d'implantation. Nous pourrions comparer les nombres de fœtus entre ceux ayant une induction d'expression des isoformes d'Akt et celles n'ayant pas subi cette induction artificielle.

Des traitements réduisant l'expression d'Akt durant le processus de décidualisation pourraient rétablir la situation et permettre d'avoir un utérus accueillant pour un embryon.

### **3.3 Conclusion**

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude montrent que les trois isoformes d'Akt sont d'importants facteurs dans la régulation de la décidualisation des cellules stromales endométriales humaines. De plus, cette étude est innovatrice étant donné qu'elle met en lumière le rôle d'Akt dans la décidualisation et son impact potentiel lors d'une surexpression d'Akt. Ainsi, la présente étude permet de constater que les trois différentes isoformes d'Akt ont des rôles distinctes et qu'une surexpression inadéquate d'Akt1 et Akt2 induisent une diminution de l'expression des marqueurs de décidualisation. Cela est corrélé avec une induction plus faible de la décidualisation. Une plus faible induction de la décidualisation peut se solder pour une préparation insuffisante de l'endomètre pour accueillir un fœtus et ainsi causer des problèmes d'implantation embryonnaire. L'étude de l'expression des isoformes Akt et leurs impacts différents sur le processus de décidualisation des cellules endométriales permet d'envisager de nouvelles avenues dans le traitement et le diagnostic de certains cas d'infertilité féminine.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bushnik, T., et al., *Estimating the prevalence of infertility in Canada*. Hum Reprod, 2012. **27**(3): p. 738-46.
2. Johnson, M.H. and B.J. Everitt, *Reproduction*. 1re édition ed. série Pasteur, ed. S. médicales. 2002, Paris. 298.
3. Chapdelaine, P., et al., *Decidualization and maintenance of a functional prostaglandin system in human endometrial cell lines following transformation with SV40 large T antigen*. Molecular Human Reproduction, 2006. **12**(5): p. 309-319.
4. Marieb, E.N., *Anatomie et physiologie humaines*. Troisième édition ed. 2005, Canada: ERPI. 1288.
5. Tortora, G.J. and M.T. Nielsen, *Principles of human anatomy*. 13th edition. ed. 2014, Hoboken, NJ: Wiley. xxiv, 894 pages, 66 pages diversement numérotées.
6. Tortora, G.J. and B. Derrickson, *Principles of anatomy & physiology*. 14th edition. ed. 2014, Hoboken, NJ: Wiley. xxvii, 1127 pages, 73 pages diversement numérotées.
7. Tortora, G.J. and B. Derrickson, *Principles of Anatomy and Physiology*. 13th Edition ed. 2010, United States of America. 1344.
8. Gerard J. Tortora, S.R.G., *Principes d'anatomie et de physiologie*. 2000, Canada.
9. Silverthorn, D.U. and B.R. Johnson, *Physiologie humaine : une approche intégrée*. 4e éd. ed. 2007, Paris: Pearson Education France. xxxiv, 936 p.
10. Irwin, J.C., et al., *Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization*. Fertil Steril, 1989. **52**(5): p. 761-8.
11. Brosens, J.J., et al., *Human endometrial fibroblasts immortalized by simian virus 40 large T antigen differentiate in response to a decidualization stimulus*. Endocrinology, 1996. **137**(6): p. 2225-31.
12. Daly, D.C., I.A. Maslar, and D.H. Riddick, *Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium*. Am J Obstet Gynecol, 1983. **145**(6): p. 672-8.
13. Gellersen, B. and J. Brosens, *Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair*. J Endocrinol, 2003. **178**(3): p. 357-72.
14. Telgmann, R. and B. Gellersen, *Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene*. Human Reproduction Update, 1998. **4**(5): p. 472-479.
15. Brosens, J.J., N. Hayashi, and J.O. White, *Progesterone Receptor Regulates Decidual Prolactin Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells*. Endocrinology, 1999. **140**(10): p. 4809-4820.
16. Brar, A., et al., *Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP*. Endocrine, 1997. **6**(2): p. 301-307.
17. Lubahn, D.B., et al., *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11162-6.



18. Lydon, J.P., et al., *Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities*. Genes Dev, 1995. **9**(18): p. 2266-78.
19. Ramathal, C.Y., et al., *Endometrial decidualization: of mice and men*. Semin Reprod Med, 2010. **28**(1): p. 17-26.
20. Maslar, I.A. and D.H. Riddick, *Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle*. Am J Obstet Gynecol, 1979. **135**(6): p. 751-4.
21. Maslar, I.A., et al., *Prolactin production by the endometrium of early human pregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 1980. **51**(1): p. 78-83.
22. Tang, B. and E. Gurpide, *Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **47**(1-6): p. 115-21.
23. Frank, G.R., et al., *Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation*. Endocrinology, 1994. **134**(1): p. 258-63.
24. Huang, J.R., et al., *Regulation of prolactin production by progestin, estrogen, and relaxin in human endometrial stromal cells*. Endocrinology, 1987. **121**(6): p. 2011-7.
25. Zhu, H.H., et al., *Differential effects of progestin and relaxin on the synthesis and secretion of immunoreactive prolactin in long term culture of human endometrial stromal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **71**(4): p. 889-99.
26. Fei, D.T., et al., *Cyclic AMP response to recombinant human relaxin by cultured human endometrial cells--a specific and high throughput in vitro bioassay*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **170**(1): p. 214-22.
27. Meera, P., et al., *Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel activity via protein kinase A*. Am J Physiol, 1995. **269**(2 Pt 1): p. C312-7.
28. Spaulding, S.W., *The ways in which hormones change cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase subunits, and how such changes affect cell behavior*. Endocr Rev, 1993. **14**(5): p. 632-50.
29. Kajihara, T., J.J. Brosens, and O. Ishihara, *The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy*. Med Mol Morphol, 2013. **46**(2): p. 61-8.
30. Thibault, C. and M.-C. Levasseur, *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Nouv. éd. ent. ref. ed. 2001, Paris: INRA : Ellipses. 928 p.
31. Freeman, M.E., et al., *Prolactin: structure, function, and regulation of secretion*. Physiol Rev, 2000. **80**(4): p. 1523-631.
32. Bole-Feysot, C., et al., *Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice*. Endocr Rev, 1998. **19**(3): p. 225-68.
33. Staal, S.P., *Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(14): p. 5034-7.
34. Nicholson, K.M. and N.G. Anderson, *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cellular Signalling, 2002. **14**(5): p. 381-395.
35. Yang, J., et al., *Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(12): p. 940-4.

36. Fabi, F. and E. Asselin, *Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus*. Reproduction, 2014. **148**(5): p. R85-95.
37. Scheid, M.P. and J.R. Woodgett, *Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 108-12.
38. Liao, Y. and M.C. Hung, *Physiological regulation of Akt activity and stability*. Am J Transl Res, 2010. **2**(1): p. 19-42.
39. Bellacosa, A., et al., *Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications*. Oncogene, 1993. **8**(3): p. 745-54.
40. Altomare, D.A., et al., *Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin*. Oncogene, 1998. **16**(18): p. 2407-11.
41. Brodbeck, D., P. Cron, and B.A. Hemmings, *A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9133-6.
42. Katso, R., et al., *Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 615-75.
43. Miao, B., et al., *Small molecule inhibition of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) binding to pleckstrin homology domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(46): p. 20126-31.
44. Samuels, Y. and K. Ericson, *Oncogenic PI3K and its role in cancer*. Curr Opin Oncol, 2006. **18**(1): p. 77-82.
45. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
46. LoPiccolo, J., et al., *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations*. Drug Resist Updat, 2008. **11**(1-2): p. 32-50.
47. Woodgett, J.R., *Recent advances in the protein kinase B signaling pathway*. Current Opinion in Cell Biology, 2005. **17**(2): p. 150-157.
48. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
49. Ozes, O.N., et al., *NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 82-5.
50. Cho, H., et al., *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38349-52.
51. Garofalo, R.S., et al., *Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 197-208.
52. Easton, R.M., et al., *Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1869-78.
53. Dai, D.L., M. Martinka, and G. Li, *Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases*. J Clin Oncol, 2005. **23**(7): p. 1473-82.
54. Pinton, G., et al., *Perifosine as a potential novel anti-cancer agent inhibits EGFR/MET-AKT axis in malignant pleural mesothelioma*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36856.

55. Meuillet, E.J., *Novel inhibitors of AKT: assessment of a different approach targeting the pleckstrin homology domain*. Curr Med Chem, 2011. **18**(18): p. 2727-42.
56. Garrett, C.R., et al., *Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of triciribine phosphate monohydrate, a small-molecule inhibitor of AKT phosphorylation, in adult subjects with solid tumors containing activated AKT*. Invest New Drugs, 2011. **29**(6): p. 1381-9.
57. Sabbah, M., et al., *Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers*. Drug Resist Updat, 2008. **11**(4-5): p. 123-51.
58. Sato, R., et al., *Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Targets*. Stem Cells, 2016.
59. Yao, D., C. Dai, and S. Peng, *Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(12): p. 1608-20.
60. Mege, R.M., et al., *Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(19): p. 7274-8.
61. Oltean, S., et al., *Alternative inclusion of fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIc in Dunning prostate tumors reveals unexpected epithelial mesenchymal plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14116-21.
62. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
63. de Herreros, A.G., et al., *Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 135-47.
64. Newkirk, K.M., et al., *Snai2 expression enhances ultraviolet radiation-induced skin carcinogenesis*. Am J Pathol, 2007. **171**(5): p. 1629-39.
65. Na, Y.R., et al., *Bone morphogenetic protein 7 induces mesenchymal-to-epithelial transition in melanoma cells, leading to inhibition of metastasis*. Cancer Sci, 2009. **100**(11): p. 2218-25.
66. Yee, D.S., et al., *The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 162.
67. Hong, K.O., et al., *Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2009. **28**: p. 28.
68. van der Velden, L.A., et al., *Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and squamous cell carcinomas of the larynx*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 1997. **254**(8): p. 376-83.
69. Zuo, L., W. Li, and S. You, *Progesterone reverses the mesenchymal phenotypes of basal phenotype breast cancer cells via a membrane progesterone receptor mediated pathway*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(3): p. R34.

70. Zhou, X.D. and Y.M. Agazie, *Inhibition of SHP2 leads to mesenchymal to epithelial transition in breast cancer cells*. Cell Death Differ, 2008. **15**(6): p. 988-96.
71. Veillette, A., et al., *Regulation of the PI3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium*. Biol Reprod, 2013. **88**(3): p. 79.